ARBEITEN

AUS DEM

KAISERLICHEN GESUNDHEITSAMTE.

(Beihefte zu den Veröffentlichungen des Kaiserlichen Gesundheitsamtes.)

Bibliothek des Kgl. Instituts für Infektionskrankheiten „Robert Koch“ BERLIN.

VIERZIGSTER BAND.

MIT 11 TAFELN UND IN DEN TEXT GEDRUCKTEN ABBILDUNGEN.

BERLIN.
VERLAG VON JULIUS SPRINGER.
1912.

DOI: https://doi.org/10.25646/6352

Inhalts-Verzeichnis.

Erstes Heft. Ausgegeben im Mai 1912. Seite

Beitrag zur Kenntnis der „antiaggressiven" Sera. Von Prof. Dr. F. Neufeld, Regierungsrat und Dr. Kandiba (Charkow), ehemal. freiwill. Hilfsarbeiter im Kaiserl. Gesundheitsamte 1

Über quantitative Verhältnisse bei der Antikörperwirkung. Von Dr. E. Ungermann, wissenschaftl. Hilfsarbeiter, und Dr. L. Kandiba, ehem. freiwill. Hilfsarbeiter im Kaiserl. Gesundheitsamte 24

Über „perkutane" Infektion mit Spirochaeten des russischen Rückfallfiebers, der Hühnerspirochaetose und der Kaninchen-Syphilis. Von Dr. phil. C. Schellack, ständigem Mitarbeiter im Kaiserl. Gesundheitsamte. (Hierzu Tafel I.) 78

Zur Kenntnis des Pebrine-Erregers, *Nosema bombycis* Nägeli. Von Dr. J. Ohmori, Prof. an der Kaiserl. Techn. Hochschule für Seidenbau in Uyeda, Japan. (Hierzu Tafel II.) 108

Zweites Heft. Ausgegeben im Juni 1912.

Experimentelle Untersuchungen über das Gift der Larve von Diamphidia simplex Péringuey (Diamphidia locusta Fairmaire). Von Prof. Dr. L. Haendel, Regierungsrat im Kaiserl. Gesundheitsamte, und Stabsarzt Dr. E. Gildemeister, kommandiert zum Kaiserl. Gesundheitsamte. (Hierzu Tafel III.) 123

Über die Wirkungen des Eosins auf Tiere. I. Teil. Fütterungsversuche mit Eosin und Eosingerste. Von Dr. med. vet. C. Titze, Regierungsrat und Mitglied des Kaiserl. Gesundheitsamtes 143

II. Teil. Pharmakologische Untersuchung des Eosins, mit Berücksichtigung der Wirkungen des Fluoreszeins und Erythrosins. Von Dr. med. E. Rost, Regierungsrat und Mitglied des Kaiserl. Gesundheitsamtes 171

Über die Übertragung von Krankheiten durch einheimische stechende Insekten. II. Teil. Von Prof. Dr. A. Schuberg, Regierungsrat im Kaiserl. Gesundheitsamte, und Dr. Ph. Kuhn, Oberstabsarzt der Schutztruppe und Medizinalreferent beim Gouvernement Kamerun, früher beurlaubt zum Kaiserl. Gesundheitsamte 209

Über Zelleinschlüsse bei Trachom und Conjunctivitiden. Von Dr. W. Böing, wissenschaftl. Hilfsarbeiter im Kaiserl. Gesundheitsamte 235

Drittes Heft. Ausgegeben im Juli 1912.

Über verbesserte Herstellung von Milchseren und ihre Anwendbarkeit zur Untersuchung der Milch. Von Dr. B. Pfyl und Dr. R. Turnau, wissenschaftl. Hilfsarbeitern im Kaiserl. Gesundheitsamte 245

Seite

Nachprüfung einiger wichtiger Verfahren zur Untersuchung des Honigs. Von Dr. J. Fiehe, wissenschaftl. Hilfsarbeiter im Kaiserl. Gesundheitsamte, und Dr. Ph. Stegmüller, früherem wissenschaftl. Hilfsarbeiter im Kaiserl. Gesundheitsamte 305

Viertes Heft. Ausgegeben im September 1912.

Vergleichende Untersuchungen über verschiedene Choleraelektivnährböden. Von Prof. Dr. Haendel, Regierungsrat im Kaiserl. Gesundheitsamte, und Oberarzt Dr. Baerthlein, kommandiert zum Kaiserl. Gesundheitsamte 357

Über Mutationserscheinungen bei Bakterien. Von Oberarzt Dr. med. Baerthlein, kommandiert zum Kaiserl. Gesundheitsamte. (Hierzu Tafel IV—XI.) 433

Beitrag zur Kenntnis der „antiaggressiven“ Sera.

Von

Prof. **Dr. F. Neufeld,**
Regierungsrat

und

Dr. Kandiba (Charkow),
ehemal. freiwilligem Hilfsarbeiter

im Kaiserl. Gesundheitsamte.

Trotz der vielfachen Fortschritte, die in den letzten Jahren in der Erkenntnis der Wirkungsweise der antiinfektiösen Immunsera gemacht worden sind, gibt es eine Reihe von Sera, bei denen uns über die Art ihrer Wirkung nichts sicheres bekannt ist, und zwar befinden sich darunter auffallenderweise gerade solche Sera, deren Schutz- und Heilwert allgemein anerkannt ist. Für diese Sera oder mindestens für einen Teil derselben wird von der Bailschen Schule angenommen, daß sie „antiaggressiv“ wirken, ihre Wirkung ist „nicht gegen die Bakterienleiber gerichtet, sondern gegen jenen Stoff, welcher eine unerläßliche Vorbedingung für eine erfolgreiche Infektion darstellt, gegen das Aggressin“ (Weil und Braun). Daher werden die Immunstoffe dieser Sera durch die betreffenden Bakterien nicht gebunden, die Sera lassen sich also im Gegensatz zu bakteriziden und bakteriotropen Sera durch Behandlung mit den Bakterien nicht erschöpfen. Auf dieses Kriterium legen die genannten Autoren besonderen Wert, sie trennen danach die Antisera in zwei Gruppen: diejenigen, die sich durch Absorption mit den betreffenden Bakterien erschöpfen lassen, sind die bakteriziden und bakteriotropen Sera, die anderen die antitoxischen und antiaggressiven. Die letztgenannten beiden Arten von Sera sollen sich nach Weil und Braun u. a. auch dadurch unterscheiden, daß die antiaggressiven Sera im Gegensatz zu den antitoxischen durch Komplementbindung in vivo unwirksam werden. Diese letzte Beobachtung wird allerdings in der neuesten Arbeit der Bailschen Schule von Spät etwas anders gedeutet, es soll dazu nicht ein komplementbindendes System, z. B. mit Antistoffen beladene Bakterien notwendig sein, sondern auch nicht sensibilisierende Bakterien sollen dieselbe Wirkung haben, und zwar dadurch, daß sie die von den Leukozyten abgegebenen bakteriziden Stoffe binden.

Als hauptsächlichstes Kennzeichen der antiaggressiven Sera gelten aber ihre negativen Eigenschaften: Sie sollen keine Antitoxine, Lysine oder Tropine enthalten; es ist dies also ein Beweis per exclusionem.

Ferner sollen die Erreger im immunen Körper ohne Schädigung desselben persistieren, „was aus der Wirkungsweise des Immunserums leicht erklärlich erscheint“ (Spät). Schließlich soll charakteristisch sein, daß bei der antiaggressiven Immunität

nur eine Immunisierung mit lebenden Erregern möglich ist; nur lebende Bakterien sollen Aggressin produzieren und daher die Bildung von Antiaggressin veranlassen.

Die letzteren beiden Momente dürften kaum als allgemeine Kriterien zur Beurteilung der Serumwirkung geeignet sein. Daß Bakterien eine zeitlang im immunen Organismus ohne Schädigung desselben vegetieren können, ist nicht nur bei der antitoxischen, sondern wohl auch bei jeder Art der antiinfektiösen Immunität denkbar. Einmal ist nicht an jeder Stelle des Körpers die Anwesenheit der wirksamen Antistoffe in genügender Konzentration zu erwarten, andererseits ist es denkbar, daß insbesondere da, wo es sich nicht um maximal virulente Keime handelt, das spezifische Serum zwar zunächst die Mehrzahl der Erreger vernichtet, daß aber die übrigen dann langsam den natürlichen Widerstandskräften des Organismus erliegen. Schließlich ist auch in Betracht zu ziehen, daß unter gewissen Umständen eine Immunisierung der Erreger gegen die Antikörper, eine „Serumfestigkeit" eintreten kann. Kurzum, das Moment des Persistierens der Erreger im anscheinend immunen Organismus ist zwar interessant und einer weiteren Aufklärung wert, aber nicht geeignet, daraufhin eine antiaggressive Wirkung des betreffenden Immunserums anzunehmen.

Was schließlich die Anschauung betrifft, daß eine hochgradige Immunität, da wo das Aggressin im Spiele ist, nur durch Behandlung mit lebenden Erregern eintreten soll, so ist darauf zu verweisen, daß zuweilen auch bakteriotrope Antistoffe, z. B. solche gegen Streptokokken und Pneumokokken, sich nur schwer durch Behandlung mit toten Bakterien oder Bakterienprodukten erzeugen lassen. Übrigens sei bemerkt, daß Weil früher angegeben hat, daß vielfach tote Bakterien ebenso gut wie lebende eine Aggressinwirkung ausüben.

Vom Standpunkt der Aggressinlehre sollte man als Grundbedingung auch den Nachweis der „Aggressivität", d. h. der infektionsbefördernden Wirkung z. B. von Exsudaten ansehen; was speziell das Rotlaufserum betrifft, so wird allerdings in der neuesten Publikation von Spät eine Anzahl einschlägiger Versuche mitgeteilt, deren Ergebnis der Verfasser jedoch selbst als dürftig bezeichnet.

Es dürfte daher für den Nachweis der antiaggressiven Wirkung eines Immunserums hauptsächlich der negative Beweis, daß ein Serum spezifisch wirksam ist, ohne einen der bekannten Antikörper zu enthalten, in Betracht kommen, und in zweiter Linie der Nachweis, daß die wirksamen Stoffe des Serums nicht an die Erreger gebunden werden. Diese beiden Punkte haben vom Standpunkt der allgemeinen Immunitätslehre auch dann ein hohes Interesse, wenn man daraus noch nicht ohne weiteres im Sinne von Bail, Weil und ihren Mitarbeitern auf das Vorhandensein einer antiaggressiven Wirkung schließen will. Im folgenden haben wir ein als typisch antiaggressiv erklärtes Immunserum zunächst in Bezug auf den ersten Punkt einer eingehenden Untersuchung unterzogen. Betreffs des zweiten Punktes sei nur darauf hingewiesen, daß negative Ergebnisse bei Absorptionsversuchen wohl nur mit den größten Vorsicht erwartet werden dürfen. Die quantitativen Methoden zur Wertbestimmung antiinfektiöser Sera sind meist nicht sehr genau; es kann die Hälfte der Schutzstoffe oder auch darüber verloren gegangen sein, ohne daß auch bei wohl-

erprobten Methoden der Serumprüfung sofort ein deutlicher Ausschlag auftritt. Ferner muß man sich erinnern, daß z. B. die Bindung von Toxin und Antitoxin in vitro oft äußerst langsam, im Tierkörper dagegen anscheinend schneller erfolgt. Wenn man daher bei unbekannten Schutzstoffen zunächst keine spezifische Absorption findet, so ist das wohl noch kein sicherer Beweis dafür, daß sie überhaupt nicht direkt an die betreffenden Bakterien gebunden werden.

Als typisch antiaggressive Immunsera werden in mehreren Publikationen der Bailschen Schule das Milzbrand-, Rotlauf- und Hühnercholeraserum genannt. Bekanntlich ist von Bail und seinen Mitarbeitern auch für eine Reihe anderer Sera angenommen worden, daß dieselben eine besondere antiaggressive Komponente enthielten bezw. daß sich z. B. neben bakteriziden Typhussera besondere aggressive Sera gegen dieselbe Bakterienart herstellen ließen, die in ihrer Wirksamkeit von den einfach bakteriziden Sera qualitativ verschieden seien und sie in gewisser Hinsicht überträfen; diese Anschauungen haben bisher aber keine allgemeine Anerkennung gefunden. Was jedoch die oben genannten Sera betrifft, so muß wohl ohne weiteres zugegeben werden, daß es bisher nicht gelungen ist, sie in eine der bekannten Gruppen von Antisera einzureihen, und da speziell über das Milzbrand- und Rotlaufserum sehr zahlreiche erfolglose Versuche in dieser Richtung gemacht worden sind, so lag in der Tat die Vermutung nahe, daß es sich hier um eine neue, bisher unbekannte Art von Antistoffen handelt.

Von diesem Gesichtspunkte aus haben wir die Frage der antiaggressiven Serumwirkung einer erneuten Untersuchung unterzogen und zwar zunächst am Rotlaufserum. Es ist dies ein Serum, dessen praktische Erfolge allgemein anerkannt sind und das sich leicht hochwertig gewinnen läßt; es hat ferner für unseren Zweck vor dem Milzbrandserum den großen Vorzug, daß es auch bei kleinen Versuchstieren eine starke und quantitativ meßbare Schutzwirkung zeigt. Das Milzbrandserum hat dagegen bekanntlich bei unseren kleinen Versuchstieren keine sichere Schutzwirkung, es ist daher nicht völlig beweisend, wenn man z. B. finden würde, daß es bei diesen Tieren keine spezifische Bakteriolyse oder Phagozytose auslöst. Ebensowenig dürften negative Ergebnisse in vitro bei Phagozytose- und Bakterizidieversuchen mit Sera und Zellen dieser Tierarten ohne weiteres zu verwerten sein. Daher ist das Milzbrandserum für derartige theoretische Untersuchungen natürlich weit schwerer zugänglich.

Aus der Literatur seien die folgenden Angaben hervorgehoben, die die wechselnden Anschauungen über die Wirkungsweise unseres Serums wiederspiegeln.

Emmerich, der bekanntlich die spezifische Schutzwirkung des Blutes mit Rotlauf immunisierter Tiere entdeckt hat, sah bei seinen Versuchen mit di Mattei (1887 und 1888) und Mastbaum (1890), daß im kreisenden Blut von immunisierten Kaninchen die Bazillen in ganz kurzer Zeit zugrunde gingen, während das extravasale Blut keine bakterizide Wirkung erkennen ließ; er nahm daher an, daß von den Zellen ausgeschiedene bakterienfeindliche Stoffe die Ursache der Immunität seien. Die Bedeutung der Phagozytose für die Immunität bestreiten Emmerich und Mastbaum in eingehenden Ausführungen.

Metschnikoff (1889) sah die Bazillen bei Einspritzung unter die Haut oder in die vordere Augenkammer immunisierter Kaninchen nicht durch Auflösung, sondern durch Phagozytose verschwinden; er sah diese als Ursache der Immunität an.

Voges und Schütz (1898) nahmen auf Grund ihrer Versuche im Gegenteil eine Auflösung der Rotlaufbazillen im Serum an, wobei sie „zwei Phasen" unterschieden: „1. die Aufschließung der Bakterienhüllen durch Organtätigkeit, 2. die Zerstörung des Bakterienprotoplasmas durch bakterizide Schutzstoffe". Nur die in Teilung begriffenen Jugendformen, die noch keine ausgebildete Hülle hätten, würden vom Serum angegriffen.

Mesnil (1898) fand bei Einsaat von Rotlaufbazillen in frisches, aktives Serum immunisierter Kaninchen in vitro keine oder nur ganz geringfügige bakterizide Wirkung; dasselbe Ergebnis haben später auch Neisser und andere Untersucher gehabt. Auf Grund seiner Beobachtungen an Mäusen nimmt Mesnil die Phagozytose als Ursache der Immunität an; wir verdanken dem Autor genaue Beobachtungen über die zellulären Vorgänge bei spezifisch vorbehandelten und bei Kontrollmäusen. Bei letzteren sah M. nach intraperitonealer Injektion der Bazillen zwar schnelles Zuströmen von poly- und mononukleären Leukozyten, aber erst nach 1—1½ Stunden Beginn der Phagozytose. Trotz ihrer geringen Zahl spielen die monomukleären Zellen dabei eine große Rolle, manche können bis zu 100 Bazillen aufnehmen; die gefressenen Bazillen werden langsam aufgelöst. Dadurch erfolgt Abnahme der Bazillen, es bleiben aber stets freie Bazillen übrig; nach etwa 10—12 Stunden beginnt eine stärkere Verbreitung in den Organen. Im Gegensatz hierzu sah Mesnil bei mit Immunserum vorbehandelten Mäusen schon nach etwa ½ Stunde eine starke Phagozytose und zwar, wenigstens zunächst, fast ausschließlich durch polynukleäre Zellen einsetzen, diese Phagozytose war in etwa 4 Stunden komplett. Die Bazillen degenerieren bald in den polynukleären Zellen, sie nehmen dann die Gramfärbung nicht mehr an. Bei späteren Entnahmen, nach 24 und 48 Stunden, sieht man nur noch in den Makrophagen Reste von Bazillen. Auflösung und Granulabildung von freien Bazillen sah der Autor nicht.

Eine Bestätigung und Ergänzung erhielten die Untersuchungen Mesnils durch Schnittuntersuchungen von Jarotzki an subkutan geimpften Mäusen; auch hier ließ sich eine spezifische Phagozytose erkennen.

Im übrigen haben die Mitteilungen Mesnils in den späteren Arbeiten auffallend wenig Berücksichtigung gefunden. Marx (1901), der eine Methode der Serumprüfung an Mäusen ausgearbeitet hat, nimmt nicht dazu Stellung. Die Metschnikoffsche Phagozytoselehre fand damals in Deutschland so wenig Boden, daß eine Erklärung der Immunität durch Phagozytose meist gar nicht in Betracht gezogen wurde; erschwert wurde die Verständigung wohl auch dadurch, daß die Rotlaufimmunserumwirkung von der Metschnikoffschen Schule entsprechend der damals herrschenden Anschauung als auf Stimulinen beruhend erklärt wurde. Marx nimmt eine bakteriolytische Wirkung des Immunserums als Tatsache an, ohne jedoch bestimmte Beweise dafür anzuführen. Er schließt aus den Schutzversuchen an Mäusen, daß der Immunkörper wohl nur langsam „in die aktive Form übergeführt" wird; der Organismus der Maus enthalte das zur Aktivierung nötige Komplement nur in sehr geringen Mengen.

Ausgehend von derselben Vorstellung, daß im Tierkörper vielleicht nicht immer ein zu dem Ambozeptor des Immunserums passendes Komplement in genügender Menge vorhanden sei, hat man versucht, durch Mischung der Immunsera von verschiedenen Tierarten („Doppelserum") die praktischen Erfolge zu verbessern (Schubert). In der Tat glaubte dieser Autor feststellen zu können, daß derartiges Mischserum im Mäusekörper im Gegensatz zu dem gewöhnlichen Pferdeimmunserum sofort „komplettiert" würde. Prettner konnte das allerdings nicht bestätigen (vergl. auch Schnürer).

Bordet und Gengou (1902) wiesen im Rotlaufserum wie in vielen anderen Immunsera, mit Hilfe der Komplementbindungsmethode spezifische „Sensibilisatoren" nach.

Deutsch (1903) bestätigte diese spezifische Komplementbindung, die bei einem vorher mehrfach mit Bazillen „erschöpften" Serum ausblieb; er schließt hieraus auf eine direkte Wirkung des Serums auf die Bazillen und lehnt die Stimulintheorie ab. Er sah in frischem komplementhaltigen, 1 : 10 verdünntem Pferde-Immunserum Abtötung der Bazillen, wobei er, da die Plattenmethode infolge der Agglutination keine zuverlässigen Ausschläge gebe, besonders auf mikroskopische Feststellung der Degeneration (Gramfärbung) Gewicht legte. Daneben nahm Deutsch eine antileukotoxische Wirkung des Immunserums an, also eine ähnliche Wirkung, wie sie später von Bail als antiaggressiv bezeichnet worden ist. Wie bekannt, schließt sich ja die Bailsche Aggressintheorie an die von Deutsch und Feistmantel vertretenen Anschauungen über die Bedeutung von Leukotoxinen und Antileukotoxinen für die Infektion und Immunität an.

Nedrigailoff (1906) fand ebenfalls spezifisch komplementbindende Antikörper in einem Rotlaufserum, vermißte sie aber in einem anderen, ebenfalls gut wirksamen Serum und schloß daraus, daß sie nicht die eigentlichen Schutzstoffe darstellen. Er beobachtete ferner, ähnlich wie Gengou, daß Bazillen, die mit Serum einen Tag lang im Eisschrank in Berührung geblieben waren, nach dem Abzentrifugieren und Waschen noch virulent waren. Im Gegensatz zu andern Untersuchern sah N. dagegen Immunsera nach (einmaliger) Absorption mit Rotlaufbazillen unwirksam werden.

Prettner (1907) fand bei 24stündigem Digerieren des Immunserums mit Bazillen im Brutschrank keine Bindung der Antikörper; weder wurde das Serum dadurch unwirksam, noch verloren die Bazillen dabei ihre Virulenz.

Bei Einsaat der Bazillen in frisches, komplementhaltiges Immunserum sah Prettner keine Entwicklungshemmung, wonach er bakterizide Immunkörper ausschließt. Ebenso wenig erkennt er eine Phagozytose befördernde Wirkung an, er sah Phagozytose „nur gelegentlich und in recht geringem Grade" auftreten. Allerdings fand der Autor, daß bei passiv immunisierten Mäusen, die intraperitoneal mit Bouillon vorbehandelt worden waren, die injizierten Bazillen besonders schnell verschwanden. „Es scheint danach in der Tat das Verschwinden der Bazillen bei Gegenwart von Zellen wesentlich rascher zu erfolgen ... Phagozytose wurde aber auch jetzt kaum beobachtet." Ferner fand Prettner, daß die Schutzwirkung des Serums durch ein spezifisches Cholerapräzipitat in der Bauchhöhle aufgehoben wurde.

Bei Einspritzung von reichlich Immunserum enthalten die Organe der Maus nach Prettner nach 6 Tagen keine lebenden Bazillen mehr, dagegen sind sie bei kleineren

Serumdosen infektiös. Hierin sieht der Autor ein Argument gegen die bakterizide Wirkung des Serums; „damit reiht sich der Rotlaufbazillus jenen rätselhaften Fällen von Immunität an, wo die virulenten Erreger, ohne an Lebenskraft und Pathogenität einzubüßen, im immunen Tier ohne Schaden für dasselbe verweilen können".

Nur kurz erwähnt seien die Untersuchungen, welche nicht den Mechanismus der erworbenen, sondern der natürlichen Immunität gegen Rotlauf betreffen. Schon Gruber und Futaki (1906) stellten eine starke Opsoninwirkung von aktivem Normalserum (von Meerschweinchen) gegen Rotlauf fest; Banzhaf (1909) fand die gleiche Wirkung im Normalserum von Schweinen, Pferden, Schafen, Ziegen; noch stärker war dieselbe im Immunserum (das nur unverdünnt untersucht wurde). Weil (1909) und Spät (1911) untersuchten die Angabe bakterizider Stoffe durch Kaninchen-, Meerschweinchen-, Mäuse- und Rattenleukozyten in verschiedenen Medien.

Die Frage, ob das Rotlaufimmunserum spezifische Bakteriotropine enthält, untersuchten Neufeld und Rimpau (1905); sie berichten kurz über einige orientierende Phagozytoseversuche in vitro mit Rotlaufbazillen. Sie fanden, daß „im Reagensglase nicht ohne weiteres eine bakteriotrope Wirkung des Immunserums in derselben eindeutigen Weise, wie bei Strepto- und Pneumokokken zutage tritt, sondern daß ... bereits im normalen Serum lebhafte Phagozytose stattfindet".

Alsdann hat Staal (1909) Phagozytoseversuche in vitro mit Immunserum und Normalserum mitgeteilt, wobei das Immunserum stets mit Normalserum 1 : 10 verdünnt wurde. Er fand eine Phagozytoseverstärkung durch Immunserum; allerdings hatte auch das Normalserum bereits eine starke Wirkung. Ein Versuch mit spezifischem Pferdeserum, Normalserum (vom Schwein?) und Schweineleukozyten ergab folgendes Resultat (die Zahlen bedeuten die Prozentzahl der an der Phagozytose beteiligten Zellen):

Kochsalzkontrolle	19,3
Normalserum	46
Immunserum	90,1

Rickmann (1909) bestätigte, ohne nähere Angaben über seine Erfahrungen, diese Beobachtung von Staal.

Weil und Braun (1909) schließen aus den vorliegenden Beobachtungen, insbesondere denen von Prettner, daß die Wirkung des Rotlaufimmunserums nur eine antiaggressive sein könne.

In einer eingehenden Arbeit aus dem Bailschen Laboratorium hat in jüngster Zeit Spät (1911) zu der Frage Stellung genommen. Er fand bei Behandlung des Immunserums mit großen Bazillenmengen „trotz extremster Versuchsbedingungen"[1]) keine Abnahme der Wirksamkeit des Serums bei quantitativer Titrierung; bisweilen

[1]) In einem wichtigen Punkte sind die Versuchsbedingungen anscheinend nicht optimal gewesen; soweit sich ersehen läßt, wurden die Versuche mit konzentriertem Serum ausgeführt, die Absorption erfolgt aber bekanntlich aus verdünnten Sera viel leichter. Versuche, die inzwischen von Ungermannn durchgeführt worden sind, haben ergeben, daß es mit Sicherheit gelingt, die spezifischen Schutzstoffe aus dem Rotlauf- (und ebenso aus dem Streptokokken)serum zu entfernen, wenn man das Serum genügend verdünnt und mehrfach mit größeren Bakterienmengen behandelt. Vergl. die vorläufige Mitteilung in der „Berliner mikrobiol. Gesellschaft" vom 12. Dezember 1911 (Berl. klin. Wochenschr. 1912, Nr. 4, S. 182).

erfolgte merkwürdigerweise im Gegenteil anscheinend eine gewisse Verstärkung der Serumwirkung. Die Bordetschen Antikörper gingen dagegen bei gleicher Behandlung verloren. In Bestätigung Prettners u. a. fand Spät, daß Bakterien durch 24stündige Behandlung mit Immunserum ihre Virulenz nicht verloren. Er schließt hiernach eine bakterizide Wirkung des Immunserums mit Sicherheit aus; dementsprechend verliefen auch Plattenversuche (mit Kaninchenkomplement) negativ.

Was die Phagozytose betrifft, so kommt Spät nach seinen Beobachtungen zu demselben Schluß wie Prettner, daß nämlich bei mit Serum immunisierten Mäusen nach intraperitonealer Injektion der Kultur niemals eine nennenswerte Phagozytose auftritt.

Die Versuche Staals über Phagozytose in vitro erkennt der Autor nicht als beweisend an, die Ausschläge seien, namentlich angesichts der starken Wirkung der Normalsera zu gering, auch könnten sie z. T. durch Agglutination bedingt sein. Er selbst stellte Versuche in vitro mit Kaninchenleukozyten an, wobei er die Wirkung eines Immunpferdeserums mit der eines Normalpferdeserums, beide für sich und nach Zusatz von Kaninchenkomplement, verglich. In einem näher mitgeteilten Versuch wurde dabei das Serum stets in einer Menge von 0,05 ccm (auf 0,5 ccm Gesamtflüssigkeit, also ebenso wie bei Staal ohne Abstufung der Dosis!) verwendet und sofort, nach $^1/_4$, $^1/_2$, $^3/_4$, 1 und $1\,^1/_2$ Stunden Proben entnommen. Erst nach einer Stunde trat starke Phagozytose ein, jedoch ohne Unterschied in allen Röhrchen außer der Kochsalzkontrolle. Die Wirkung des Serums ist hiernach zwar vorhanden, aber nicht als spezifisch anzusehen.

Auf Grund aller seiner Versuche kommt Spät zu der Überzeugung, daß die Wirkung des Serums nur auf Antiaggressinen beruhen könne.

Schließlich sei auf die neuesten einschlägigen Monographien verwiesen. Nach Schnürer (in Kraus-Levaditis Handbuch) beruht die Rotlaufimmunität nicht auf einer Vernichtung der Erreger, sondern auf einem Unempfindlichwerden des Organismus gegen die schädigenden Einflüsse der Bakterien beruht („Immunität durch strukturelle Anpassung“ nach Sauerbeck). Bail und Klimmer (im Handbuch von Klimmer und Wolff-Eisner) sprechen sich für eine antiaggressive bezw. für eine antitoxische Wirkung des Rotlaufserums aus.

Spät glaubt, die Erforschung der Wirkungsweise des Rotlaufimmunserums würde neben dem theoretischen auch ein praktisches Interesse haben; er hofft, daß solche Untersuchungen „zu einer rationellen Ausgestaltung des Immunisierungsverfahrens führen“ würden. Hierfür scheinen uns keine rechten Anhaltspunkte vorzuliegen; der Autor selbst zieht auch aus seinen Untersuchungen, die ihn zu der Ansicht einer antiaggressiven Wirkung des Serums geführt haben, keine praktische Konsequenz, und ebensowenig ist aus den analogen Untersuchungen über Milzbrandserum bisher eine neue Methode zur Serumgewinnung oder zur Schutzimpfung in der Praxis hervorgegangen. Allerdings hat Beil auf Grund seiner theoretischen Vorstellung über das Aggressin in manchen Fällen mit Erfolg z. B. die Immunisierung mit Exsudaten benutzt, doch sind solche Versuche auch schon vorher von anderen Autoren (Pfeiffer) gemacht worden und wenn sie in gewissen Fällen besseren Erfolg hatten, als z. B. die Immunisierung mit abgetöteten Bakterien, so ist ein solcher Erfolg auch von einem anderen Standpunkt, als von dem der Aggressintheorie zu erklären. Man darf auch nur darauf hinweisen, daß manche unserer besten Sera, z. B. das Rinderpestserum sich leicht hochwertig herstellen und zu Heil- und Schutzversuchen

mit größtem Erfolg gebrauchen lassen, ohne daß wir über ihre Wirkungsweise einen bestimmten Anhaltspunkt hätten. In dieser Hinsicht ist daher wohl Zurückhaltung geboten und ebenso wie auf anderen Gebieten der Immunitätslehre ein unmittelbarer praktischer Erfolg nicht in Aussicht zu stellen.

Versuche über die Serumwirkung in vivo.

Zunächst schien es zweckmäßig, die Wirkung des Immunserums in vivo zu beobachten. Unsere Versuchsergebnisse stehen im Gegensatz zu denen von Prettner, Spät u. a., sie stimmen dagegen völlig mit den alten, von den neueren Autoren meist gar nicht mehr erwähnten Resultaten von Mesnil überein. Wir konnten die Versuche dieses Autors in jedem Punkte bestätigen und in einigen erweitern.

Die Versuche wurden in der Weise angestellt, daß Mäuse mit 0,25 ccm eines hochwertigen Immunserums (Serum Petersburg) vorbehandelt, 24 Stunden später mit 0,25 ccm einer Emulsion von Rotlaufbazillen (1 Agarkultur in 1,0 ccm Kochsalzlösung) infiziert, und nach verschiedenen Zeiten zur Anlagerung von Präparaten und Kulturen getötet wurden. Die Bazillen wurden stets intraperitoneal eingespritzt, die Vorbehandlung geschah bei den drei ersten Serummäusen (Entnahme bis zu 1 Stunde) ebenfalls intraperitoneal, bei den folgenden subkutan.

Um das Schicksal der Bazillen wirklich zu verfolgen, genügen fortlaufende Entnahmen von Bauchhöhlenexsudat nicht. Schon Metschnikoff hat bekanntlich mit Nachdruck darauf hingewiesen, daß man auf diese Weise sogar über die Vorgänge in der Bauchhöhle selbst oft nur recht unvollständige Aufklärung erhält und zwar vor allem deswegen, weil die Phagozyten, vielfach in Häufchen zusammengeballt, sich auf den Darmschlingen, besonders aber auf dem Netz ablagern und so der Beobachtung in Exsudatproben entgehen; auch der Übergang in das Blut und in die Organe ist bei injizierten Bakterien und körperfremden Zellen bekanntlich von Metschnikoff und seinen Schülern schon vielfach verfolgt und die Phagozytose in einer Reihe von Organen durch Freßzellen verschiedener Art festgestellt worden. Bei intraperitonealen Injektionen spielt, wie neuerdings, insbesondere von J. Koch auf Grund der Arbeiten von Weidenreich sowie nach ausgedehnten eigenen Beobachtungen hervorgehoben worden ist, das Netz als das Hauptresorptionsorgan der Bauchhöhle eine große Rolle: es stößt einerseits massenhaft Endothelzellen ab, die sich in der Bauchhöhle als Freßzellen betätigen können, und leitet anderseits durch seine Lymphbahnen sowohl freie wie phagozytierte Bakterien schnell aus der Bauchhöhle ab, wobei dieselben zum Teil in einer Art Lymphknötchen abgelagert werden können.

Es ist wohl kaum notwendig hervorzuheben, daß die Untersuchung der Proben von Peritonealexsudat, das wie bei Pfeiffers klassischen Untersuchungen dem lebenden Tier entnommen ist, nach wie vor wichtig bleibt und insbesondere zur Beobachtung bakteriolytischer Vorgänge durch nichts anderes zu ersetzen ist; nur liefert sie, wie kürzlich auch Ungermann bei seinen Pneumokokkenversuchen an Mäusen fand, zur Beobachtung der Phagozytose lange nicht so klare Bilder wie Abstriche, die beim getöteten Tier von verschiedenen Stellen der Leberoberfläche, des Netzes usw. entnommen werden.

Natürlich war es erwünscht, auch über die Vorgänge in den Organen und über die Verbreitung der Rotlaufbazillen im Mäusekörper Klarheit zu gewinnen; es wurden daher nach Verlauf verschiedener Zeit je eine Serum- und eine Kontrollmaus getötet und Deckglasausstriche von Blut, Peritonealexsudat, Netz, Retroperitonealdrüsen, Milz, Leber, Niere und Endokard angefertigt und nach Giemsa (in manchen Fällen auch einfach mit Methylenblau) gefärbt. Von diesen Ausstrichen sind in den folgenden Protokollen immer nur diejenigen erwähnt, bei denen sich ein positiver Befund, d. h. freie oder phagozytierte Bazillen, in unzweifelhafter Deutlichkeit ergab.

Dieselben Mäuse wurden zugleich zur kulturellen Untersuchung benutzt; hierzu wurde jedesmal das gesamte aufgefangene Blut der betreffenden Maus sowie je 3 Ösen Peritonealflüssigkeit auf ein Röhrchen Schrägagar verteilt, wobei natürlich nur eine ungefähre Schätzung der Bakterienzahl möglich war.

Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung.

Nach 15 Minuten.

Serummaus. Peritoneum: Viel freie Bazillen, daneben mit Bazillen erfüllte polynukleäre Leukozyten (Mikrophagen) und große mononukleäre Zellen, offenbar überwiegend Endothelzellen (Makrophagen nach Metschnikoff).

In Blut- und Organausstrichen nichts.

Kontrollmaus. Viel freie Bazillen, in den polynukleären Leukozyten niemals, in den Endothelzellen bisweilen Bazillen.

Nach 30 Minuten.

Serummaus. Peritoneum: Weniger freie Bazillen als vorher, viel polynukleäre Zellen, die fast alle mit Bazillen vollgestopft sind.

Kontrollmaus. Peritoneum: Sehr viel freie Bazillen, keine phagozytäre Tätigkeit der (spärlich vorhandenen) Polynukleären; zahlreiche Mononukleäre und Endothelzellen, z. T. mit Bakterien gefüllt.

In Blut, Leber, Milz, Retroperitonealdrüsen sind einige freie Bazillen, im Endokardabstrich eine Endothelzelle mit Bazillen nachweisbar.

Nach 1 Stunde.

Serummaus. Peritoneum: Vereinzelte freie Bazillen, viele Mikrophagen, meist voll von Bazillen, ferner Makrophagen, z. T. ebenfalls mit Bazillen gefüllt.

In Blut und Organen sind Bazillen nicht mit Sicherheit nachzuweisen.

Kontrollmaus. Peritoneum: Viel freie Bazillen; einzelne polynukleäre Zellen sind mit Bazillen gefüllt. Daneben leere mononukleäre Leukozyten und mit Bakterien gefüllte Endothelzellen.

Im Blut sind keine, in Leber, Milz, Retroperitonealdrüse vereinzelte, im Endokard etwas reichlicher Bazillen nachzuweisen.

Nach $1^1/_2$ und 2 Stunden

ähnliche Ergebnisse, Phagozytose im Peritoneum weniger, dagegen im Netz sehr deutlich, an den gefressenen Bazillen (auch in Endothelzellen) Zeichen beginnender Verdauung.

Nach 3 Stunden.

Serummaus. Im Peritoneum wenig freie Bazillen und Phagozyten, im Netz starke Phagozytose, daneben auch freie Bazillen. In Leber und Milz selten freie Bazillen und ganz vereinzelte Phagozytose durch polynukleäre Zellen.

Kontrolle. Im Peritoneum viel freie Bazillen, zahlreiche polynukleäre Zellen, aber fast keine Phagozytose. Im Netz stärkere Phagozytose durch Endothelzellen, schwache durch polynukleäre Leukozyten; großer Unterschied gegenüber der Serummaus. In Leber und Milz einzelne freie Bazillen.

Nach 5 Stunden.

Serummaus. Peritoneum: Keine freien Bazillen, viel Leukozyten, aber nur wenige davon (polynukleäre) mit schwach färbbaren Bazillen im Innern.

Im Netz Mikrophagen mit schwach gefärbten Bazillen, daneben noch freie Bazillen.

In Milz, Leber, Endokard, Niere keine Bazillen gefunden.

Kontrollmaus. Peritoneum: Zahl der Bazillen anscheinend erheblich vermindert, viel Polynukleäre, aber nur schwache Phagozytose.

In Leber, Milz, Endokard: sehr wenig freie Bazillen.

Nach 10 Stunden.

Serummaus. Peritoneum: Viel gut erhaltene Zellen (polynukleäre und Endothelzellen), keine Bazillen.

Netz: Keine freien Bazillen; selten Mikrophagen mit schwach färbbaren Bazillen, einzelne Mikrophagen in Makrophagen liegend.

In den Organen keine Bazillen.

Kotrollmaus. Peritoneum: Zahl der Bazillen vermindert, viele Zellen.

Netz: Freie Bazillen und relativ schwache Phagozytose schlecht tingierter Bazillen durch polynukleäre und Endothelzellen.

Milz und Leber: Spärliche, freie Bazillen.

Niere: Keine Bazillen.

Endokard: Wenig freie Bazillen. Endothelzellen, mono- und (selten) polynukleäre Leukozyten mit Bazillen; Häufchen von Zellen und Bazillen.

Nach 24 Stunden.

Serummaus. Peritoneum: Viele gut erhaltene Leukozyten und Endothelzellen, die bisweilen Polynukleäre gefressen haben. Keine Bazillen, keine Phagozytose.

Netz: Dasselbe.

Blut, Leber, Milz, Niere, Endokard: Keine Bazillen, keine Phagozytose.

Kontrollmaus. Peritoneum: Zahl der Bazillen noch weiter vermindert. Viele, z. T. stark geschädigte Polynukleäre und Endothelzellen, keine Phagozytose.

Netz: Spärliche Phagozytose.

Blut: Endothelzellen mit bisweilen zahlreichen Bazillen im Innern; keine freien Bazillen nachzuweisen.

Leber: Sehr spärlich, Milz: Reichlich freie Bazillen.

Endokard: Ziemlich viel Bazillen, teils frei, teils in Endothelzellen.

Niere: Viel Endothelien mit Bazillen, wenig freie Bazillen.

Nach 36 und 48 Stunden.

Serummäuse. Wie oben: Keine Bazillen, keine Phagozytose.

Kontrollen. Peritoneum: Zahl der freien Bazillen etwa gleich geblieben. Viele, meist geschädigte, Polynukleäre, die nur ganz selten Bazillen aufgenommen haben; Endothelzellen mit Bazillen sind reichlicher vorhanden.

Netz: Ähnlich, nur etwas mehr Bazillen und Phagozytose.

Blut: Ziemlich spärlich freie Bazillen und Endothelien mit Bazillen; ganz vereinzelt Polynukleäre mit Bazillen gefüllt.

Leber und Milz: Mäßig viel Bazillen, zum größeren Teile frei, zum kleineren in Endothelzellen liegend.

Niere: Viel freie Bazillen, mäßig viele in Endothelien.

Retroperitonealdrüse: Mäßig viel freie Bazillen.

Endokard: Sehr viel freie Bazillen, ziemlich viel Endothelzellen mit Bazillen.

Befund bei Kontrolltieren nach dem Tode.

Im Blut und allen Organen finden sich mäßig viel bis reichlich Bazillen, die Menge derselben schwankt bei den einzelnen Tieren ziemlich stark, relativ reichlich sind sie oft im Endokard, dann in den Nieren zu finden. Niemals findet man jedoch auch nur annähernd so zahlreiche Bazillen, wie das z. B. bei der Pneumokokkeninfektion der Mäuse die Regel ist. Überall liegen die Bazillen zum großen Teil frei, zum großen Teil in Endothelzellen, nur ausnahmsweise in polynukleären Leukozyten.

Ergebnis der kulturellen Untersuchung.

Tiere getötet nach	Serum-Mäuse		Kontroll-Mäuse	
	Blut	Peritoneum	Blut	Peritoneum
15 Minuten	mäßig viel	viel	ziemlich viel	viel
30 „	ziemlich viel	„	„	„
1 Stunde	mäßig viel	„	„	„
2 Stunden	einzelne Kolonien	mäßig	„	„
3 „	nur im Kondenswasser Wachstum	„	„	„
5 „	einzelne	spärlich	„	„
10 „	0	nur im Kondenswasser	viel	„
24 „	0	0	„	„
36 „	0	0	„	„
48 „	0	0	„	„

Technik. Das aufgefangene Blut je einer Maus bezw. je 3 Ösen Peritonealflüssigkeit werden auf Schrägagar gebracht.

Ein zweiter Versuch ergab ein ähnliches Resultat; die Blutaussaat war beim Serumtier von 6 Stunden an negativ, die Aussaat aus dem Peritoneum erst nach 36 Stunden.

Unser Ergebnis ist also, daß auch bei unbehandelten Mäusen Phagozytose eintritt, aber nur in sehr geringem Grade und spät durch Polynukleäre, reichlich dagegen durch Mononukleäre (meist jedenfalls Endothelzellen). Bei schutzgeimpften Mäusen ist dagegen charakteristisch eine ganz früh einsetzende energische Phagozytose durch polynukleäre Leukozyten; daneben findet ebenfalls eine reichliche Phagozytose durch Endothelzellen statt.

Was nun das Schicksal der gefressenen Bazillen betrifft, so haben wir stets eine langsame, aber deutliche intrazelluläre Degeneration nachweisen können; auch dies ist schon von Mesnil beobachtet worden. Ein Unterschied in dieser Hinsicht war zwischen Serum- und Kontrolltieren nicht zu bemerken, so daß sich kein Anhaltspunkt für die Annahme ergibt, daß das Serum neben der Aufnahme auch die Auflösung der Bakterien innerhalb der Zellen befördert.

Dieser charakteristische Unterschied in dem Verhalten der verschiedenen Zellarten bildet eine merkwürdige Eigentümlichkeit der Rotlaufinfektion und -immunität. Wenigstens ist uns für die Immunität gegenüber anderen Bakterienarten, insbesondere auch septizämischen, etwas ähnliches bisher nicht bekannt. Die Tatsache, daß überhaupt eine lebhafte Phagozytose bei den Kontrolltieren eintritt, ist dagegen an sich wohl nicht überraschend, da unsere Rotlaufstämme für Mäuse auch nicht annähernd

die hohe Virulenz besitzen, wie z. B. viele Streptokokken- oder Pneumokokkenkulturen. Eine maximale Virulenz, d. h. eine tödliche Wirkung der Kultur in Verdünnungen, die etwa bis zur Grenze des Keimgehaltes gehen, ist bei Rotlauf wenigstens Mäusen gegenüber wohl nicht bekannt; ein großer Teil der eingespritzten Bakterien wird also auch vom normalen Organismus unschädlich gemacht und zwar anscheinend mindestens zum großen Teil mit Hilfe von Freßzellen.

Bakterizide Versuche in vitro.

Neben den beschriebenen Tierversuchen haben wir solche in vitro angestellt und zwar zunächst bakterizide Versuche mit Immunserum unter Zusatz von normalen Serum und Plasma. Die in ersterer Hinsicht bisher publizierten Versuche sind zwar zahlreich und übereinstimmend negativ, sie schienen uns aber insofern in einem wichtigen Punkte einer Ergänzung bedürftig, als dabei nicht abgestufte Mengen von Immunserum verwendet wurden. Von anderen bakteriziden Sera ist uns aber bekannt, daß bei großen Dosen infolge von Komplementablenkung oft keine Abtötung erfolgt, während eine solche bei kleinen Dosen regelmäßig eintritt. So sind z. B. Typhus- und Cholerasera bekanntlich meist erst in einer Verdünnung 1 : 100 oder 1 : 1000 vollwirksam.

Die Tabelle 1 (S. 13) zeigt, daß beim Rotlauf das Phänomen der Komplementablenkung nicht vorliegt. Die stärkeren Verdünnungen erwiesen sich als völlig unwirksam. Nur bei der größten Dosis des Immunserums trat eine geringe Wirkung ein, die auf Agglutination oder möglicherweise auch auf Normalstoffen beruhen kann. Jedenfalls kann die spezifische Schutzwirkung des Serums nicht auf einen Stoff zurückgeführt werden, der nur eine so minimale Wirkung und auch diese nur in so starker Konzentration ausübt. Wir haben daher diese Verhältnisse nicht weiter verfolgt und auch die Wirkung des Normalpferdeserums nicht untersucht.

Eine spezifische bakterizide Wirkung ist also nirgends eingetreten. Wie man aus dem Ergebnis der Röhrchen 8 und 9 sieht, ist auch Plasma mit Immunserum zusammen nicht wirksam — eine Möglichkeit, die wir auf Grund früherer Versuche von Landsteiner, Much, Weil u. a. in Betracht ziehen zu sollen glaubten. Weitere Versuche mit Serum und Plasma von Mäusen und Meerschweinchen, die ebenfalls negativ ausfielen, werden unten in Tabelle 10 mitgeteilt.

Phagozytoseversuche in vitro (Tropinversuche).

Nach den Tierversuchen mußten wir erwarten, eine spezifisch phagozytäre Wirkung, auf Bakteriotropinen oder Immunopsoninen beruhend, in vitro zu finden. Zunächst haben wir die Tropine im Immunserum nachzuweisen gesucht, wobei wir die Technik von Neufeld und Hüne benutzten. Die Bakterien gewannen wir von Agar, und zwar aus ca. 20- bis 24stündigen Kulturen; ältere Kulturen bilden leicht Klumpen und sind dann unbrauchbar. Wir benutzten ziemlich dichte Emulsionen; nach Abgießen des Kondenswassers wurde eine Schrägagarkultur in 1,0 ccm, bisweilen auch nur 0,5 ccm, physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, 2 Tropfen dieser Emulsion

Tabelle 1. Bakterizider Plattenversuch mit hochwertigem Pferde-Immunserum (Serum Petersburg).

Abgestufte Mengen des inaktivierten (karbolfreien) Immunserums werden mit Meerschweinchen-Komplement (bezw. in 2 Röhrchen mit Zitrat-Plasma von Mäusen) und 1 Tropfen 1 : 50 verdünnter Bouillonkultur gemischt und, nachdem die Röhrchen 6 und 24 Stunden im Brutschrank gestanden haben, Agarplatten mit je 1 Tropfen gegossen; um besseres Wachstum zu erzielen, wurden dem Agar je 4 Tropfen Rinderserum zugefügt.

Da die empfindlichen Rotlaufkeime in ungünstigen Medien leicht spontan abstarben, wurde jedem Röhrchen 1 Tropfen Bouillon zugefügt; dennoch trat in den Röhrchen, die weder spezifisches, noch Normalserien enthielten (13, 14, 15), eine starke Keimverminderung ein.

In den Kontrollröhrchen wurde das fehlende spezifische Serum bezw. Komplement durch Kochsalzlösung ersetzt.

Nr.	Immunserum ccm	Komplement	Plattenaussaat nach 6 Stunden	Plattenaussaat nach 24 Stunden
1	0,2	0,1 ccm Meerschweinchen-Komplement	ca. 10 000	Tausende (Agglutination!)
2	0,1	0,1 „ „ „	„	ca. 10 000
3	0,05	0,1 „ „ „	„	„
4	0,01	0,1 „ „ „	„	„
5	0,005	0,1 „ „ „	„	„
6	0,001	0,1 „ „ „	„	„
7	0,000 5	0,1 „ „ „	„	„
8	0,2	0,1 „ Mäuse-Plasma	„	„
9	0,1	0,1 „ „ „	„	„
10	0,1	—	„	„
11	—	0,1 „ Meerschweinchen-Komplement	„	„
12	—	0,1 „ Mäuse-Plasma	„	„
13	—	—	Tausende	0
14	—	0,2 „ Natriumzitrat-Bouillon	ca. 10 000	Hunderte
15	—	0,1 „ „ „	„	„

mit 2 Tropfen Meerschweinchenleukozyten und der betreffenden Serumverdünnung gemischt und nötigenfalls mit Kochsalzlösung auf 0,3 ccm aufgefüllt. Die Entnahmen geschahen meist nach $1^1/_2$, in einem Falle schon nach einer halben Stunde. Das Resultat war in diesem Falle annähernd dasselbe wie bei späterer Entnahme. Nach mehrfachen Versuchen mit verschiedenen Färbemethoden fanden wir, daß die Färbung nach Giemsa die besten Resultate lieferte.

Die spezifischen Sera, die uns zur Verfügung standen, waren drei aus Petersburg stammende Proben von Pferdeserum, die ohne Karbolzusatz zum Teil einzeln, zum Teil als Mischserum von allen drei Proben verwendet wurden, ferner eine Probe hiesigen Immunserums; letztere war mit Karbol versetzt. Zur Kontrolle dienten normales inaktiviertes Pferdeserum, sowie Pneumokokken- und Streptokokkenpferdeserum; letzteres war mit Trikresol versetzt. Die Ergebnisse sind aus den folgenden Tabellen ersichtlich.

Tabelle 2. Phagozytoseversuch in vitro Technik nach Neufeld-Hüne.

Drei hochwertige, karbolfreie Immunsera (Petersburger Pferdesera) werden gleichzeitig mit einem mit Trikresol versetzten Kontrollpferdeserum (Streptokokkenserum) untersucht. Benutzt wurden Meerschweinchenleukozyten.

Entnahme nach $1^1/_2$ Stunden. Färbung nach Giemsa.

Serummenge ccm	Stärke der Phagozytose mit			
	Immunserum Pferd 1	Immunserum Pferd 3	Immunserum Pferd 7	Streptokokkenserum
0,3	+++	+++	+++	0
0,1	+++	+++	+++	fast 0
0,03	+++	+++	+++	++
0,01	+++	+++	+++	+
0,003	++	+++	++	0
0,001	++	++	++	—
0,000 3	++	++	++	—
0,000 1	++	++	++	—

Kontrollen mit Kochsalzlösung nach $1^1/_2$ und 3 Stunden: 0.

Tabelle 3. Phagozytose in vitro.

Sera: Immunserum (Petersburger Mischserum von 3 Pferden), Pneumokokkenserum, Normalpferdeserum. Alle Sera ohne Karbol; bei 58° inaktiviert.

Entnahmen nach $1^1/_2$ Stunden. Giemsafärbung.

Serummenge ccm	Immunserum	Normalpferdeserum	Pneumokokkenserum
0,3	. (nicht untersucht)	+	±
0,1	.	+	±
0,03	.	±	fast 0
0,01	.	fast 0	0
0,003	.	0	0
0,001	++	0	0
0,000 3	++	0	0
0,000 1	+	0	0
0,000 03	±	.	.
0,000 01	0 (Spur)	.	.

Kontrolle mit Kochsalzlösung: 0.

Tabelle 4. Phagozytose in vitro.

Berliner Immunserum (Pferdeserum mit Karbol konserviert).

Menge des Immunserums ccm	Entnahme nach $^1/_2$ Stunde	Entnahme nach $1^1/_2$ Stunden
0,05	+	+
0,03	+	+
0,01	++	++
0,003	+++	+++
0,001	++	++
0,000 3	±	+
0,000 1	±	±
— (Kontrolle)	0	0

Die beiden in dieser Tabelle vereinigten Versuche (mit $^1/_2$- bezw. $1^1/_2$stündiger Bebrütung) sind mit Leukozyten von zwei verschiedenen Meerschweinchen angestellt und daher nicht exakt miteinander zu vergleichen.

Wie aus der Tabelle 2 hervorgeht, zeigen alle drei Petersburger Serumproben annähernd im gleichen Maße eine phagozytäre Wirkung, die mindestens bis 0,0001 ccm herabgeht. Die untere Grenze wurde in diesem Versuch nicht festgestellt. In den Kontrollen mit Kochsalzlösung wurde weder nach $1^1/_2$ noch nach 3 Stunden eine irgend nennenswerte Phagozytose beobachtet; nur ganz selten fand sich ein intrazellullärer Bazillus. Dagegen erfolgte in dem Streptokokkenserum eine nicht unbeträchtliche, noch bei 0,01 ccm deutliche Phagozytose. Daß hier im Gegensatz zu den Rotlaufsera die Röhrchen mit stärksten Serumgehalt negativ waren, beruht auf dem Kresolzusatz. Ein Vergleich unserer Versuche mit denen der früheren Autoren zeigt wohl deutlich die Überlegenheit der von uns benutzten Methodik.

Die Tabelle 3 zeigt die Wirkung des aus den drei Petersburger Serumproben hergestellten Mischserums im Vergleich mit dem Serum normaler bezw. anderweitig immunisierter Pferde. Auch hier zeigt sich durch Vergleich mit den Kochsalzkontrollen, daß Normalpferdeserum durchaus nicht wirkungslos ist, aber die Wirkung des homologen Immunserums geht soweit darüber hinaus, daß ein Zweifel an der Spezifität der Wirkung nicht möglich ist.

Wenn unsere Schlußfolgerungen mit denen von Staal übereinstimmen, so zeigen die Versuche doch wohl, daß gerade beim Rotlaufserum der sichere Nachweis der bakteriotropen Wirkung nur durch Untersuchung abgestufter Verdünnungen zu erbringen ist, da im anderen Falle Verwechslungen mit der oft nicht unbeträchtlichen Wirkung des Normalserums eintreten können. Dies ist wohl auch der Grund, weshalb Neufeld und Rimpau früher, zu einer Zeit, wo die genaue qantitative Methode des Tropinversuchs noch nicht ausgebildet war, hinsichtlich des Rotlaufserums zu keinem deutlichen Resultat kamen.

Die letzten beiden Versuche (Tabelle 4) zeigen, daß auch die Berliner Probe von Rotlaufserum stark phagozytär wirkte, daß dieses Serum aber, wie auch in weiteren Versuchen bestätigt wurde, quantitativ nicht unerheblich schwächer war als das Petersburger Serum.

Schutzwirkung der benutzten Immunsera im Tierversuch.

Dem Verhalten unserer Sera in vitro entsprach das Ergebnis der Prüfung im Tierversuch. Wie aus den folgenden Tabellen hervorgeht, zeigte das Petersburger Serum bei einem Versuch nach der Marxschen Methode noch in einer Dosis von 0,0001 ccm eine Schutzwirkung gegen 0,025 ccm Rotlaufbouillonkultur, während das Berliner Serum in der Menge von 0,003 ccm nicht mehr sicher schützte. Also ist auch im Versuch am Tiere ebenso wie in vitro das Petersburger Serum deutlich hochwertiger, was in späteren Versuchen mehrfach bestätigt wurde. Die absolute Höhe des Schutzwertes zeigte dagegen in verschiedenen Versuchen nicht unerhebliche Schwankungen, was wohl mit der etwas wechselnden Virulenz der Kultur zusammenhängt; in den kleinen Dosen schützten unsere Sera keineswegs regelmäßig.

Über die Wirkung von Normalpferdeserum geben die Versuche der Tabellen 6 und 7 Auskunft. Sie sind mit demselben Normal- und demselben Strepto- bezw.

Pneumokokkenserum angestellt, wie die Phagozytose-Versuche in Tabelle 2 und 3. Es scheint, daß das in vitro am stärksten wirksame Streptokokkenserum auch in vivo eine Wirkung hatte, indem es in der Menge von 0,2 ccm den Tod des Tieres ganz erheblich verzögert. Ähnliche Beobachtungen über eine schwache Schutzwirkung von Normalserum sind schon von anderen Autoren gemacht worden.

Tabelle 5. Schutzwirkung der Immunsera.

Prüfung an Mäusen nach Marx. Das Serum wird subkutan am Rücken, die Kultur (24stündige Bouillonkultur) am nächsten Tage intraperitoneal eingespritzt.

Die Kulturdosis von 0,025 ccm war jedenfalls ein mehrfaches Multiplum der tödlichen Dosis; die minimale tödliche Dosis wurde nicht jedesmal festgestellt, sie betrug etwa 0,001 ccm 24stündiger Bouillonkultur, doch kamen gewisse Schwankungen vor.

Nr.	Serummenge ccm	Bouillonkultur ccm	Petersburger Immunserum (Mischserum)	Berliner Immunserum
1	0,01	0,025	lebt	lebt
2	0,01	0,025	„	„
3	0,003	0,025	„	„
4	0,003	0,025	„	† nach 5 Tagen
5	0,001	0,025	„	† „ 6 „
6	0,001	0,025	† nach 9 Tagen	† „ 5 „
7	0,000 1	0,025	lebt	† „ 4 „

Kontrollen. 1. 0,025 ccm † nach 4 Tagen
2. 0,025 „ † „ 6 „

Tabelle 6. Schutzwirkung von normalem inaktivem Pferdeserum.

Dieselbe Versuchsanordnung; Prüfung mit 0,025 ccm Bouillonkultur.

Nr.	Serummenge ccm	
1	1,0	† nach 5 Tagen
2	0,5	† „ 2 „
3	0,25	† „ 3 „
4	0,1	† „ 2 „
5	0,01	† „ 5 „
6	0,001	† „ 1 Tag
7	0,000 1	† „ 1 „

Tabelle 7. Schutzwirkung heterologer Pferdeimmunsera.

Dieselbe Versuchsanordnung.

Serummenge ccm	Pneumokokkenserum	Streptokokkenserum
1,0	† nach 5 Tagen	.
0,5	† „ 2 „	.
0,2	† „ 2 „	† nach 9 Tagen (verzögert!)
0,1	† „ 4 „	† nach 6 Tagen
0,01	† „ 3 „	† „ 4 „
0,001	† „ 5 „	† „ 3 „

Agglutinierende Wirkung unserer Immunsera.

Unsere Immunsera zeigten auch eine erhebliche Agglutinationswirkung, dieselbe steht, wie die nachfolgende Tabelle zeigt, anscheinend annähernd in Parallele mit ihrem Gehalt an Schutzstoffen.

Tabelle 8. Agglutinationswirkung der benutzten Sera.

1 Agarkultur wird in 1,0 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Das Ergebnis wird nach 12stündigem Aufenthalt im Brutschrank notiert.

Serum-verdünnung	Petersburger Immunserum	Berliner Immunserum	(Kontroll-)Strepto-kokkenserum	(Kontroll-)Pneumo-kokkenserum
1 : 10	+ +	+ +	+	+
1 : 100	+ +	+ +	Spur	0
1 : 1000	+ +	Spur	0	0
1 : 10 000	Spur	0	0	0

Opsoninversuche in vitro.

Während bei den oben mitgeteilten Phagozytoseversuchen stets inaktives Serum benutzt wurde, haben wir in den folgenden Versuchen die opsonische Wirkung des aktiven normalen Mäuseserums festzustellen versucht. Dabei wurde die Technik von Leishman-Wright benutzt; je ein Teil des aktiven Serums, bezw. der Serumverdünnung wurde mit einem Teil Bakterienemulsion und einem Teil Leukozyten (Blutsediment) in Kapillaren gemischt. Das Blutsediment wurde teils von Mäusen, teils von Menschen gewonnen. Die Bakterienemulsion wurde in derselben Weise wie oben beschrieben durch Aufschwemmung einer 24 stündigen Kultur in 1,0 ccm Kochsalzlösung hergestellt; für weitere Versuche nach dieser Technik würden wir jedoch die Benutzung einer weniger dichten Emulsion empfehlen. Nach derselben Methode haben wir auch gleichzeitig ein spezifisches Pferdeserum austitriert und daneben dieselben Verdünnungen des spezifischen Serums mit Zusatz einer geringen an sich unwirksamen Komplementmenge untersucht. Da die Ausschläge deutlich genug waren und in den Kontrollen die Phagozytose fast völlig ausblieb, so konnte auf eine Zählung der gefressenen Bakterien verzichtet werden.

Tabelle 9. Phagozytoseversuch nach Leishman-Wright mit aktivem Mäuseserum und mit Pferdeimmunserum.

Das Blutsediment wird teils von Menschen-, teils von Mäuseblut gewonnen, die Emulsion durch Aufschwemmung einer 24stündigen Agarkultur in 1,0 ccm Kochsalzlösung hergestellt; je ein Teil Serum, Blut, Emulsion (event. dazu noch ein Teil Komplement) werden in einer Kapillare gemischt und 1 Stunde bebrütet. Färbung nach Giemsa.

a) Normales Mäuseserum I.

Serum-verdünnung	Mit Menschen-leukozyten	Mit Mäuse-leukozyten
unverdünnt	+ +	+ (Leukozyten geschädigt)
1 : 2	+ +	+ +
1 : 5	+	+ +
1 : 10	±	fast 0
1 : 50	0	0
1 : 100	0	0
Kontrolle	0	0

b) Normales Mäuseserum II.

Serum-verdünnung	Mit Menschen-leukozyten	Mit Mäuse-leukozyten
unverdünnt	+ +	+ +
1 : 2	+ +	+ +
1 : 5	+	+ +
1 : 10	fast 0	fast 0
1 : 50	0	0
1 : 100	0	0

c) Rotlaufserum Petersburg Nr. 3 mit menschlichen Leukozyten.

Serumverdünnung	Nur Immunserum	Immunserum + 1 Teil $^1/_{10}$ Normalmäuseserum (Maus I)
1 : 10	+ + +	.
1 : 100	+ +	.
1 : 1000	+ +	+ + +
1 : 10 000	+ +	+ +
1 : 100 000	0	0
1 : 1 000 000	0	0
1 : 10 000 000	0	0

Wie die Tabelle zeigt, besaßen die beiden geprüften Normal-Mäusesera eine deutliche opsonische Kraft, die sich noch in der Verdünnung 1 : 5 (oder wenn man die weitere durch Zusatz von Leukozyten und Bakterien entstehende Verdünnung in Rechnung zieht, bis 1 : 15) hinunter bemerkbar machte. Es ist aber hervorzuheben, daß die Phagozytose mit aktivem Normalserum niemals annähernd so stark wurde, wie in den Röhrchen mit spezifischem Serum. Dabei war in den Röhrchen mit menschlichen Leukozyten die Phagozytose um ein geringes stärker als in denen mit Mäuseleukozyten. Mit inaktivem normalen Mäuseserum wurde kein gleichzeitiger Versuch gemacht, doch geht aus der nächstfolgenden Tabelle hervor, daß normales Mäuseserum nach dem Inaktivieren keine oder doch nur eine ganz geringe phagozytäre Wirkung besitzt, also im Gegensatz zum Pferdeserum keine nennenswerten Mengen von Tropinen enthalten dürfte.

Nach derselben Technik wurde auch ein hochwertiges Immunserum untersucht, das sich bis 1 : 10 000 gut wirksam erwies; bei Zusatz von 1 : 10 verdünntem Mäusekomplement trat dabei zum mindesten keine erhebliche Verstärkung ein, sodaß wenigstens dieser eine Versuch keinen Anhaltspunkt für die Annahme bietet, daß in unserem Serum neben den Tropinen auch Immunopsonine wirksam sind. Bei ganz genauer Berechnung wäre übrigens zu berücksichtigen, daß bei diesem letzteren Versuch alle Röhrchen ca. 8 % weniger spezifisches Serum enthalten, als bei dem Parallelversuch ohne Komplement, da in dem letzteren Falle das spezifische Serum mit 2, im ersteren Fall dagegen mit 3 Teilen Flüssigkeit verdünnt wird.

Versuche über bakterizide und bakteriotrope Wirkung von Serum und Plasma passiv immunisierter Mäuse.

Wir haben einige Versuche mit Serum und Plasma passiv immunisierter Mäuse angestellt, wobei die betreffenden Tiere mit 0,25 ccm unseres hochwertigen Immunserums vorbehandelt und 24 oder 48 Stunden später getötet wurden. In weiteren Fällen wurden Mäuse in derselben Weise passiv immunisiert, erhielten dann aber am nächsten Tage noch lebende Rotlaufkultur injiziert und wurden 24 oder 48 Stunden danach entblutet. Zunächst stellten wir bakterizide Versuche an. Wenn die oben mitgeteilten Versuche eine bakterizide Wirkung von Immunserum und Komplement,

wie sie bei den bekannten bakteriziden Sera stets so deutlich eintritt, nicht ergeben hatten, so erschien es doch möglich, daß eine solche Wirkung bei Benutzung von Mäusekomplement eintreten könnte, oder auch daß in unbekannter Weise ein andersartiger bakterizider Immunkörper im Mäuseorganismus eine Aktivierung erfahren würde. Dies war jedoch nicht der Fall, vielmehr zeigte in unseren Versuchen weder das Serum noch das Plasma der Mäuse irgend eine bakterizide Wirkung. Auch bei Tieren, die nach der Seruminjektion noch eine Injektion lebender Kultur erhalten hatten, lieferten die Versuche kein anderes Ergebnis.

Wir haben dann mit demselben Serum und Plasma, nachdem dieselben zur Ausschaltung der Opsoninwirkung inaktiviert waren, Phagozytose-Versuche angestellt. Dieselben fielen positiv aus und zeigten, daß das Blut der vorbehandelten Tiere nach 24 und 48 Stunden noch genug spezifische Antistoffe enthielt, um auch in vitro zu wirken. Die phagozytäre Wirkung war, wie der gleichzeitig angestellte Versuch mit dem Immunserum zeigt, quantitativ etwa hundertmal geringer, als die des benutzten Immunserums selbst, was ungefähr der Verdünnung, die das Serum im Mäusekörper erfährt, entsprechen würde.

Die Sera der Mäuse, die nach der passiven Immunisierung noch lebende Kultur erhalten hatten, zeigten, 24 bezw. 48 Stunden nach der Infektion entnommen, etwa ebenso starke Wirkung, wie die der einfach passiv immunisierten Tiere, es war also dabei ein Verbrauch der Antikörper nicht nachzuweisen. Dies könnte auffällig erscheinen, doch ist zu bedenken, daß eine recht große Menge Immunserum eingespritzt wurde, von dem man wohl nicht anzunehmen braucht, daß sie vollständig verbraucht sein müßte; wenn aber z. B. auch 50% der injizierten Tropine verbraucht wären, so würde man doch bei der angewandten Methode nicht notwendigerweise eine deutliche Verminderung zu erwarten haben. Natürlich ist auch die langsame und ungleichmäßige Resorption des Serums in Betracht zu ziehen. Ein entsprechendes Ergebnis hatte ein zweiter derartiger Versuch. Auch hier war eine bakterizide Wirkung von Serum und Plasma der passiv immunisierten, bezw. außerdem mit Kultur geimpften Maus nicht vorhanden, eine deutliche bakteriotrope Wirkung dagegen nachweisbar. Dieselbe war schwächer als im vorigen Fall entsprechend der Verwendung unseres schwächeren Immunserums. Die Einzelheiten der Versuche sind aus den nachstehenden Tabellen ersichtlich.

Tabelle 10.

Versuche über bakterizide und bakteriotrope Wirkung von Serum und Plasma passiv (mit Petersburger Immunserum) immunisierter Mäuse.

Serum A: Serum von einer Maus, die 24 Stunden vorher 0,25 ccm Immunserum subkutan erhalten hat.

Plasma B: Zitratplasma (3 Teile Blut + 1 Teil 2,5% Natr. citr.) einer ebenso behandelten Maus.

Serum C: Serum einer ebenso vorbehandelten Maus, die 24 Stunden später 0,3 ccm einer Rotlaufbazillenemulsion (1 Agarkultur in 1,0 ccm aufgeschwemmt) intraperitoneal erhalten hat; Serumentnahme 24 Stunden nach der Kulturinjektion.

Serum D: Serum einer wie bei C behandelten Maus, aber 48 Stunden nach der Kulturinjektion entnommen.

I. Bakterizider Plattenversuch mit frischem Mäuseserum und -plasma.

Die Versuchsanordnung ist dieselbe, wie in Tabelle 1 beschrieben. Nach 6stündiger Bebrütung werden aus jedem Röhrchen 2 Tropfen in Serumagar ausgesät.

Serummenge ccm	Serum A	Plasma B	Serum C
0,2	∞	∞	∞
0,1	∞	∞	∞
0,01	∞	∞	∞
0,001	∞	∞	∞

Kontrolle: Tausende Kolonien.

Gleichzeitig wird ein bakterizider Plattenversuch mit Rotlaufimmunserum (Petersburg) und Meerschweinchenplasma gemacht; die Versuchsanordnung ist im übrigen dieselbe, wie im vorigen Versuch.

0,1	inakt. Immunserum	+	0,1	Plasma:	hunderttausende Kolonien (Agglutination)
0,01	„ „	+	0,1	„	„ „
0,001	„ „	+	0,1	„	∞
0,000 1	„ „	+	0,1	„	∞
0,000 01	„ „	+	0,1	„	∞
—	—		0,1	„	∞
—	—		0,1	Zitratbouillon	∞
—	—		0,2	„	∞
0,1	inakt. Immunserum		—		∞

II. Phagozytoseversuch mit denselben Sera und Plasma, nachdem sie inaktiviert sind.

Technik nach Neufeld-Hüne, wie in Tab. 2.

Gleichzeitig wird, mit denselben Leukozyten, ein normales inaktives Mäuseserum, sowie das Petersburger Immunserum untersucht.

Serum- bezw. Plasmamenge ccm	Serum A	Plasma B	Serum C	Serum D	Inakt. Normalmäuseserum
0,1	++	+	+	++	0
0,03	+	+	+	+	0
0,01	+	+	+	+	0
0,003	±	+	+	+	0
0,001	±	+	+	+	0
0,000 3	0	±	.	.	.
0,000 1	0	.	.	.	.

Petersburger Immunserum.

0,001	++
0,000 3	++
0,000 1	++
0,000 03	+
0,000 01	±

Kontrolle mit Kochsalzlösung: 0.

Tabelle 11.

Ein zweiter Versuch wurde mit Serum und Plasma passiv immunisierter und darauf infizierter Mäuse in folgender Weise angestellt.

Serum A. Die Maus erhält 0,2 ccm Immunserum subkutan, 24 Stunden später 0,2 ccm Bazillenemulsion intraperitoneal und wird wieder 24 Stunden später entblutet.

Plasma B. Maus ebenso behandelt, Blutentnahme erst nach 48 Stunden.

Es wurde das (schwächere) Berliner Immunserum verwendet.

I. Plattenversuche. Versuchsanordnung wie vorher; Aussaat a) nach 6, b) nach 24 Stunden.

Ergebnis: Aus allen Röhrchen mit Serum und Plasma kommen einige 10000 Keime zur Entwicklung; in den Kontrollen zeigt sich ähnlich wie im Versuch der Tabelle 1 eine fortschreitende Keimverminderung (durch Nahrungsmangel).

II. Phagozytoseversuche.

Serum- bezw. Plasmamenge ccm	Phagozytose		
	mit Serum A (inakt.)	mit Plasma B (inakt.)	mit Normalmäuseserum (inakt.)
0,1	+	+	±
0,03	+	+	0
0,01	±	fast 0	0
0,003	0	0	0
0,001	0	0	0

Kontrolle: 0

Gesamtmenge der Flüssigkeit stets 0,3.

Ergebnisse.

Aus den vorstehenden Untersuchungen ergibt sich, daß sich sowohl in vitro wie im Tierkörper eine spezifische bakteriotrope Wirkung der von uns untersuchten Sera unzweideutig nachweisen läßt; wir sehen in ihr die Ursache der Schutz- und Heilkraft des Serums. Wenn diese spezifische Wirkung bisher von der überwiegenden Mehrzahl der Untersucher nicht erkannt worden ist, so liegt das wohl, soweit Versuche in vitro in Betracht kommen, hauptsächlich daran, daß auch normale Sera eine recht erhebliche Tropinwirkung entfalten können, so daß hier nur genaue quantitative Versuche mit abgestuften Serummengen zu einwandfreien Resultaten führen. Im Tierversuch entgeht aber das entscheidende Moment, nämlich die Phagozytose durch polynukleäre Leukozyten, leicht der Beobachtung, da auch bei den Kontrolltieren eine reichliche Phagozytose stattfindet, die aber viel später einsetzt und niemals so stark ist und bei der ferner fast ausschließlich große mononukleäre Zellen beteiligt sind.

Verglichen mit den virulenten Pneumo- und Streptokokken, denen gegenüber ebenfalls eine bakteriotrope Immunität besteht, liegen die Verhältnisse hier, abgesehen von der Mühe, die das Auffinden der zarten, sich im Mäuseorganismus niemals sehr stark vermehrenden Stäbchen macht, deswegen viel verwickelter, weil wenigstens bei der von uns untersuchten Tierart eine ganz beträchtliche normale Immunität besteht. Wenn der Organismus eines unbehandelten Tieres, wie im vorliegenden Falle, imstande ist, viele Tausende von Keimen einer bestimmten Bakterienart unschädlich zu machen (0,001 ccm unserer Bouillonkultur, eine nicht mehr sicher tödlich wirkende Dosis,

enthielt nach Plattenaussaaten über 300000 Keime), so ist es eigentlich selbstverständlich, daß man von vornherein mit der Möglichkeit rechnen muß, als Ursache der spezifischen Immunität nur eine quantitative Steigerung normaler Schutzkräfte zu finden. In vielen Fällen ist es allerdings anders, indem die vielleicht erheblichen normalen Schutzkräfte durch die Immunisierung nicht gesteigert werden, sondern neben ihnen ganz andere Kräfte auftreten. So ist es, um ebenfalls ein Beispiel von passiver Immunisierung zu wählen, nach Schneider bei Meerschweinchen, die intraperitoneal mit (virulenten) Pneumokokken infiziert werden. Von diesen werden nach den Beobachtungen Schneiders in der Bauchhöhle des normalen Meerschweinchens recht beträchtliche Mengen ohne Beteiligung von Phagozyten frei im Exsudat aufgelöst; wird aber spezifisches Immunserum dazu gegeben, so tritt nicht eine Steigerung der lytischen Prozesse, sondern etwas ganz Neues, nämlich eine lebhafte Phagozytose ein. Soweit diese Verhältnisse bis jetzt untersucht sind, scheint es sich bei den lytischen Normalstoffen hier nicht um eine Alexine, sondern um Leukine zu handeln (vergl. die Untersuchungen von Much und von Dold), von denen zum mindesten noch nicht sicher erwiesen ist, daß sie einer spezifischen Steigerung fähig sind. Bei der Rotlaufimmunität der Maus ist es aber anders, hier spielt die Phagozytose nicht nur bei der künstlichen, sondern auch bei der natürlichen Immunität eine Rolle; qualitativ besteht allerdings ein charakteristischer Unterschied inbezug auf die Art der beteiligten Freßzellen.

Wenn wir uns nun fragen, ob die Wirkung des von uns untersuchten Serums ausschließlich auf Tropinen beruht, so kann man wohl nur sagen, daß für die Annahme der Mitwirkung anderer Antistoffe bisher ein Beweis oder auch nur ein bestimmter Anhaltspunkt nicht vorliegt; u. E. lassen sich auch alle tatsächlichen Beobachtungen über die spezifische Serumwirkung auf Tropine zurückführen. Die Möglichkeit, daß in Zukunft noch anderweitige wirksame Antikörper im Rotlaufserum aufgefunden werden, ist natürlich vorhanden; die Bedeutung solcher Antikörper müßte dann aber ebenso klar nachgewiesen werden, wie es unserer Ansicht nach für die Tropine geschehen ist. Der Begriff der antiagressiven Immunität scheint uns aber wenigstens bisher durch keinerlei zwingende experimentelle Tatsachen gestützt zu sein und unsere Beobachtungen haben uns keine Anhaltspunkte für die Existenz einer derartigen Form der Immunität geliefert.

Literatur.

Bail, Handbuch der Serumtherapie usw. von Klimmer und Wolff-Eisner, S. 23. 1911.
Banzhaf, Inaug.-Dissert. Gießen 1909.
Bordet u. Gengou, Ann. Pasteur 1901, S. 289.
Deutsch, Zentralbl. f. Bakt. Orig. Bd. 33, S. 214. 1903.
Dold, Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. 36, S. 419.
Emmerich u. di Mattei, Fortschr. d. Med. 1887 u. 1888.
Emmerich u. Mastbaum, Arch. f. Hygiene Bd. 12, 1890.
Gruber u. Futaki, Münch. med. Wochenschr. 1906, S. 249.
Jarotzki, Arch. russes de Pathol. etc. 1902, Zentralbl. f. Bakteriol. Orig. Bd. 44, S. 76. 1907.

Klimmer, Handbuch der Serumtherapie usw. von Klimmer und Wolff-Eisner, S. 35. 1911.
Jos. Koch, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 69. 1911.
Marx, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1901.
Mesnil, Ann. Pasteur 1898, S. 481.
Metschnikoff, Ann. Pasteur, 1889, S. 289.
Much, Münchener med. Wochenschr. 1908, S. 572 u. 1909, 2662.
Nedrigailoff, Zentralbl. f. Bakteriol. Orig. Bd. 41, S. 89. 1906.
Neisser, Ehrlichs Gesammelte Arbeiten, S. 493. 1904.
Neufeld u. Rimpau, Zeitschr. f. Hygiene Bd. 51, S. 298.
Prettner, Zentralbl. f. Bakt. Bd. 43, S. 832. 1907.
Rickmann, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1909, S. 643.
Schneider, Zeitschr. f. Immunitätsf. Ref. III, S. 652.
Schnürer, Handbuch von Kraus-Levaditi-Ergänzungsb. II, S. 302. 1911.
Schubert, Berl. tierärztl. Wochenschr. 1902, S. 289.
Spät, Zeitschr. f. Hygiene Bd. 69, S. 463. 1911.
Staal, Zentralbl. f. Bakt. Orig. Bd. 49, S. 226.
Voges, Zeitschr. f. Hygiene Bd. 22.
Voges u. Schütz, Deutsche med. Wochenschr. 1898, S. 49.
Weil, Archiv f. Hygiene Bd. 71, S. 223. 1909.
Weil u. Braun, Fol. serol. 1909, Heft 7.

Über quantitative Verhältnisse bei der Antikörperwirkung.

Von

Dr. E. Ungermann, und **Dr. L. Kandiba,**

wissenschaftlichem Hilfsarbeiter ehem. freiwilligem Hilfsarbeiter

im Kaiserlichen Gesundheitsamte.

Die vielfachen Mißerfolge auf dem Gebiet der Serumtherapie haben zahlreiche Untersuchungen über die qualitative Seite der Antikörperwirkung im Gefolge gehabt. Wenn die Antisera bei Cholera, Typhus, bei Streptokokkenerkrankungen und anderen Infektionen in der Praxis versagten, ist die Schuld von vielen Autoren der Qualität dieser Sera zugeschoben worden und man glaubte zu besseren Resultaten gelangen zu können, wenn es ermöglicht würde, Antikörper gegen gewisse, bei der Erzeugung der Krankheitssymptome besonders beteiligte Komponenten oder Produkte des Bakterienleibes zu erhalten. Diese Anschauung hat zu den Versuchen mit antitoxischen und antiendotoxischen Seris geführt, deren besonderer Wert aber bisher jedenfalls noch nicht mit Sicherheit erwiesen wurde. Ferner ist vielfach versucht worden, mit polyvalenten Immunsera bessere Erfolge zu erzielen, auch wurden z. B. bei Streptokokken Änderungen des Rezeptorenapparates der zur Gewinnung des Immunserums benützten Bakterienstämme durch Tierpassagen oder durch längere Kultur auf künstliche Nährböden als Ursache der Wirkungslosigkeit des mit diesen Stämmen erzeugten Antiserums in der Praxis angesehen. Schließlich ist auch die von Ehrlich hervorgehobene Möglichkeit, daß ein heterologer Antikörper in dem zu schützenden Organismus nicht komplettiert werden könne, als Grund für die Wirkungslosigkeit antiinfektiöser Sera beim Menschen herangezogen worden, so kürzlich von Zangemeister, welcher vermutet, daß das im Tierkörper so ausgezeichnet wirkende Streptokokkenserum beim Menschen deshalb keine Heilwirkungen entfalten könne, weil es hier kein passendes Komplement vorfinde.

Fast niemals hat man aber die nächstliegende Frage, auf die schon Pfeiffer im Beginn seiner Studien über die bakteriziden Sera hingewiesen hat, experimentell zu lösen versucht, nämlich die Frage, ob die betreffenden Sera quantitativ stark genug sind, um eine Heilwirkung beim Menschen wahrscheinlich erscheinen zu lassen, und in welcher Dosis man ein Immunserum beim Menschen anwenden müßte, um den gewünschten Erfolg überhaupt erwarten zu können.

Die Anschauung, daß bei der Wirkung des Pneumokokkenserums die quantitativen Verhältnisse, abgesehen von den Schwierigkeiten, die in einer Minderzahl von Fällen durch das Vorkommen atypischer Stämme eintreten, das allein Ausschlaggebende sind, haben Neufeld und Haendel mehrfach ausgesprochen. Danach würde ein genügend starkes Serum voraussichtlich beim Menschen eine ebenso gute Wirkung entfalten, wie im Tierkörper.

Dabei erhebt sich aber sogleich die Frage, in welchen Mengen man das bei kleinen Versuchstieren gute Wirkungen entfaltende Antiserum bei größeren Tieren und beim Menschen geben muß, um die gleichen Erfolge zu erzielen. Muß man, wenn man zunächst einmal gleiche Verhältnisse, insbesondere gleiche natürliche Schutzkräfte voraussetzt, bei einem größeren Tiere entsprechend größere Mengen des Immunserums anwenden, oder genügt annähernd die gleiche Dosis, die ein kleines Tier vor der Infektion schützt, gegen die gleiche Infektionsdosis auch bei einem großen? Theoretisch sind zwei extreme Fälle denkbar: Entweder ein Antikörper wirkt rein nach der Verdünnung, d. h. entsprechend dem prozentualen Gehalt der Körpersäfte an dem wirksamen Stoff, dann ist bei einem hundertmal schwereren Tier auch hundertmal mehr Serum zu geben; oder aber er wirkt nach der absoluten Menge, dann müßte die ein kleines Tier schützende Dosis auch bei einem größeren Tier der gleichen Infektionsmenge gegenüber annähernd dieselbe Wirkung entfalten.

Dieselbe Frage entsteht, wenn man bei der gleichen Tierart die Menge des Antigens, d. d. des Infektionsstoffes, mit in Betracht zieht; wirkt der Antikörper nach der Verdünnung, dann wird die gleiche Quantität gegen kleinere und größere Antigenmengen etwa gleich gut schützen, wirkt er aber nach der absoluten Menge, so werden sich zwischen der zum Schutz erforderlichen Serumdosis und der Quantität des Antigens einfache Beziehungen herausstellen. Natürlich könnten diese Gesetze nur innerhalb gewisser Grenzen gelten, aber auch unter dieser Bedingung wäre die Frage, ob die Antikörper mehr nach der einen oder der anderen Weise wirken, von Interesse. Obwohl uns diese Fragen bei allen Heil- oder Schutzversuchen mit antifektiösen Seris entgegentreten und für die Praxis von großer Bedeutung sind, ist ihre Prüfung bisher noch nicht systematisch durchgeführt worden.

Nun hat R. Scheller[1]) in einer experimentellen Arbeit über den Mechanismus der Komplement- und Ambozeptorwirkung aus seinen Versuchen Schlüsse gezogen, die für die hier aufgeworfene Frage von Bedeutung sind. Dem Autor gelang es festzustellen, daß zwischen der Wirkungsweise des hämolytischen Ambozeptors und des Komplements ein bemerkenswerter und durchgreifender Unterschied besteht. Er fand, ebenso wie bereits vorher Kiß, daß zur Lysis einer gleichen Menge gleich stark sensibilisierter Blutkörperchen bei 2- bis 8-facher Verdünnung mit Kochsalzlösung auch die entsprechend größere 2- bis 8-fache Komplementmenge nötig war und daß ferner diejenige Komplementdosis, die $^1/_2$ ccm sensibilisierter Blutkörperchen zur Auflösung brachte, auch dazu genügte, im gleichen Volumen 4 ccm derselben zu hämo-

[1]) Experimentelle Beiträge zum Studium des Mechanismus der Immunkörper und Komplementwirkung. Zentralblatt für Bakteriologie. Originale Bd. 61, S. 120. Vergl. auch Bericht über die Tagung der mikrobiolog. Vereinigung 1911.

lysieren. Der hämolytische Ambozeptor dagegen wirkte bei gleicher Menge von Blutkörperchen im einfachen wie im doppelten und achtfachen Volumen von Kochsalzlösung gleich stark sensibilisierend. Während also (innerhalb gewisser Grenzen) das Komplement zu der Menge des vorhandenen Antigens in keinerlei Beziehungen steht und bei seiner Wirkung alles auf den Konzentrationsgrad ankommt, wirkt der Ambozeptor unabhängig von der Konzentration streng nach seiner absoluten Menge, steht daher in den engsten Beziehungen zur Menge des Antigens, aber nicht zum Volumen des Gemisches. Der Autor schließt daraus, daß dem Antikörper bei der Hämolysereaktion die eigentliche wichtigste Bedeutung zukomme und daß das Komplement dabei nur die Rolle eines Katalysators spiele.

Die Frage, ob die antibakteriellen Immunkörper im gleichen Sinne wirken wie der hämolytische, hat Scheller in seiner Arbeit nicht berührt.

Von vornherein liegt wohl kein Grund zu der Annahme vor, daß sich die Reaktionen zwischen bakteriellem Antigen und Antikörper nach anderen Verhältnissen vollzögen, wenigstens nicht in einem biologisch neutralen Medium, wie es die Kochsalzlösung im Reagenzglasversuch darstellt. Aber auch in diesem Falle war es noch fraglich, ob die Reaktionen zwischen Bakterien und Immunkörper im Organismus, der sich beiden Komponenten gegenüber gewiß nicht indifferent verhalten dürfte, nach denselben Gesetzen von statten gehen.

Wir sind nun an das Problem der quantitativen Verhältnisse bei der Antikörperwirkung zunächst mehr vom praktischen Standpunkte herangetreten, wir haben die Wirkungsweise mehrerer Immunsera im Tierkörper nach ihrer quantitativen Seite verfolgt und als sich hier zum Teil ganz andere Verhältnisse ergaben als in den Reagenzglasversuchen Schellers, haben auch wir die Wirkung einiger Immunkörper in vitro untersucht; da wir dabei je nach den Versuchsbedingungen teils zu den gleichen, teils zu anderen Ergebnissen kamen wie der Autor, so versuchten wir es, die Ursache dieser Verschiedenartigkeit der Wirkungsweise der Antikörper unter den verschiedenen Bedingungen zu erkennen.

Über einen Teil der hier mitgeteilten Versuche ist bei Gelegenheit der 5. Tagung der freien Vereinigung für Mikrobiologie in Dresden schon berichtet worden.

A. Untersuchungen über die Wirkungsweise von Immunseris im Tierkörper.

Versuche mit Pneumokokkenserum.

Unsere Versuche über die quantitativen Verhältnisse bei der Wirkung des Antipneumokokkenserums schlossen sich an Untersuchungen von Neufeld und Händel über den gleichen Gegenstand an. Aus diesen an der Maus durchgeführten Untersuchungen ergab sich die bemerkenswerte Tatsache, daß eine Serummenge, die überhaupt sichere Schutzwirkungen entfaltete, gegen große Infektionsdosen fast ebenso gut schützte wie gegen kleine und daß andererseits eine Verminderung oder ein gänzliches Versagen der Schutzwirkung bei fallender Serummenge sich kleinen Bakterienmengen gegenüber fast ebenso sehr geltend machte wie bei großen. Es bestand demnach also keine direkte quantitave Beziehung zwischen der Serummenge und der Infektionsdosis.

Bei diesen Versuchen wurde das Serum intraperitoneal appliziert, die Kultur 3 Stunden später ins Peritoneum injiziert. Es machte indessen nach Versuchen von Neufeld und Händel und von uns bei der Maus keinen erheblichen Unterschied aus, wenn der Zeitraum variiert oder das Serum subkutan einverleibt wurde.

Die folgende Tabelle ist aus den von Neufeld und Händel (Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamte Bd. 34, S. 177 f.) publizierten Versuchen zusammengestellt. Sie zeigt, welche Schutzwirkung fallende Serummengen bei der Maus entfalten.

Tabelle 1. Schutzwirkung des Pneumokokkenserums (Pferd II) bei Mäusen.

Menge des Serums ccm	Menge der Pneumokokken-bouillonkultur ccm	Anzahl der Versuchsmäuse	Davon		Prozentzahl der geretteten Tiere %
			leben	sind tot	
0,2	0,1	2	2	—	100
0,2	0,01	2	2	—	
0,2	0,001	2	2	—	
0,2	0,000 1	2	2	—	
0,02	0,01	4	—	4	0
0,02	0,001	4	2	2	50
0,02	0,000 1	5	1	4	20
0,02	0,000 01	2	1	1	50
0,02	0,000 001	3	1	2	33
0,002	0,001	2	—	2	0
0,002	0,000 1	3	—	3	0
0,002	0,000 01	2	—	2	0
0,002	0,000 001	3	—	3	0

Während also 0,2 ccm des Pneumokokkenserums gegen die große Dosis von 0,1 ccm der Pneumokokkenkultur, das mindestens 100000fache Multiplum der kleinsten tödlichen Dosis, mit Sicherheit schützt, leistet die 10fach kleinere Serummenge gegenüber der 10fach kleineren Kulturdosis überhaupt keine Schutzwirkung; sie schützt aber auch gegen sehr viel kleinere Kulturmengen nur unvollkommen und dabei ganz unregelmäßig. Der hundertste Teil der gut wirksamen Serumquantität schützt überhaupt nicht mehr, auch nicht gegen Mengen, die wenig über der kleinsten tödlichen Dosis liegen.

Im Organismus der Maus wirkt das Pneumokokkenserum somit keineswegs nach dem Gesetz der multiplen Proportionen; die zum Schutz erforderlichen Serummengen steigen bezw. fallen sehr viel langsamer als die Kulturdosen.

Wir haben nun diese quantitativen Untersuchungen über den Schutzwert des Pneumokokkenserums durch analoge Versuche am Kaninchen weitergeführt. Das Kaninchen eignet sich dafür deswegen etwas weniger als die Maus, weil seine Empfänglichkeit für die Pneumokokkeninfektion, obwohl die Virulenz unseres Stammes auch für diese Tierart eine sehr hohe war, kleinen Schwankungen unterworfen ist, so daß in größeren Versuchsreihen mitunter ein Tier, das eine sonst tödliche Kulturdosis erhalten hatte, am Leben blieb, während solche, die mit einer noch kleineren

Dosis geimpft worden waren, eingingen. Demgemäß traten auch in den Serumversuchen Unregelmäßigkeiten stärker hervor. Vielleicht würde die Virulenz für Kaninchen bei häufigeren Passagen durch diese Tierart ebenfalls ganz konstant werden; unsere Pneumokokkenstämme hatten fast ausschließlich Mäusepassagen durchgemacht.

Das Serum wurde fast stets intravenös, nur in einem Versuche auch subkutan einverleibt; die Kultur wurde drei Stunden später in das subkutane Gewebe des Ohres injiziert. Das Gewicht der zu diesen Versuchen benutzten Tiere schwankte zwischen 1800 und 2500 g.

In den folgenden Versuchen wurde die Schutzkraft einer großen und einer 10fach kleineren Dosis desselben Immunserums geprüft. Das Ergebnis zeigen die beiden Tabellen.

Tabelle 2. Versuch vom 19. 5. 1911. Schutzwirkung des Antipneumokokkenserums beim Kaninchen.

(Karbolfreies Pferdeserum D. III.)

Menge der Kultur ccm	Versuchsreihe mit 20 ccm Serum		Versuchsreihe mit 2 ccm Serum		Kontrollen ohne Serum
	Subkutane Applikation	Intravenöse Applikation	Subkutane Applikation	Intravenöse Applikation	
0,1	† nach 3 Tagen	† nach 3 Tagen	—	—	—
0,01	† „ 4 „	† „ 2 „	† nach 6 Tagen	† nach 5 Tagen	—
0,001	† „ 8 „	Tier lebt	† „ 4 „	† „ 2 „	
0,000 1	† „ 10 „	„ „	† „ 3 „	† „ 3 „	† nach 2 Tagen
0,000 01	—	—	† „ 3 „	Tier lebt	
0,000 001	—	—	—	—	

Tabelle 3. Versuch vom 12. 9. 1911. Schutzwirkung desselben Antipneumokokkenserums beim Kaninchen.

Menge der Kultur ccm	Vorbehandlung intravenös mit 20 ccm Serum	Vorbehandlung intravenös mit 2 ccm Serum	Vorbehandlung mit 20 ccm Normalserum	Kontrollen ohne Serum
0,01	† nach 2 Tagen	† nach 1 Tag	—	—
0,001	Tier lebt	† „ 1 „	—	—
0,000 1	† nach 3 Tagen	† „ 2 Tagen	—	—
0,000 01	Tier lebt	† „ 2 „	† nach 1 Tag	† nach 1 Tag
0,000 001	„ „	† „ 3 „	† „ 1 „	† „ 2 Tagen

Demnach gewähren 20 ccm dieses Immunserums, intravenös gegeben, dem Kaninchen einen nicht ganz sicheren, aber doch recht erheblichen Schutz. Allerdings starben alle Kaninchen, die 0,1 oder 0,01 Kultur erhalten hatten; von den sechs mit Dosen von 0,001 und darunter geprüften Tieren ging dagegen nur eins ein. Bei subkutaner Serumapplikation trat bei denselben Infektionsdosen nur eine, allerdings erhebliche Verzögerung des Todes ein; die Wirkung des Serums ist also, soweit dieser eine Versuch ein Urteil gestattet, bei subkutaner Anwendung erheblich schlechter.

Die 10fach kleinere Serumdosis war fast völlig wirkungslos, auch bei intravenöser Anwendung blieb von den sieben mit Dosen von 0,001 und darunter infizierten Tieren nur eins am Leben.

Tabelle 3 zeigt ferner, daß auch große Mengen von Normalserum keinerlei Schutzwirkungen ausübten.

Während also bei der etwa 20 g schweren Maus 0,2 ccm des Serums zur Erzielung einer ausreichenden Schutzwirkung genügten, ist dazu bei dem etwa 100mal schwereren Kaninchen (wir wählten zu den Versuchen, wie schon erwähnt, Tiere um 2000 g) auch eine 100mal größere Serummenge erforderlich; eine Serumdosis, die nur um das 10fache kleiner ist als die gut wirkende versagt auch gegen Infektionsdosen, die der kleinsten tödlichen Bakterienmenge nahe stehen, fast vollkommen.

Daraus folgt, daß das Serum bei den für den Pneumokokkenstamm fast gleich hoch empfänglichen Tierarten, für die Maus und das Kaninchen, ungefähr die gleiche Wirkungskraft entfaltet. Die zur Schutzwirkung erforderliche Serummenge ist in erster Linie vom Körpergewicht abhängig und steht zu diesem bei beiden Tierarten im ungefähren Verhältnis von 1 : 100. Direkte quantitative Beziehungen zwischen Antikörper und Antigen sind aber bei der Schutzwirkung in keinem Falle zu erkennen. Natürlich haben die soeben gegebenen Zahlen nur eine annähernde Gültigkeit. Es soll auch keineswegs behauptet werden, daß der „Schwellenwert" für die beiden Tierarten bei genau derselben Verdünnung liegen muß; das in unseren Kaninchenversuchen benutzte Serum war ferner nicht dasselbe, mit dem die Mäuseversuche angestellt wurden, es hatte bei der Prüfung an Mäusen eine etwas geringere Schutzwirkung. Von dem anderen Serum standen uns leider nicht genügende Mengen zur Verfügung, auch war dasselbe mit Karbolglyzerin versetzt und konnte daher den Kaninchen nicht in so großen Dosen gegeben werden.

Im ganzen kann aus den Versuchen mit Pneumokokken geschlossen werden, daß sich der Antikörper des Pneumokokkenserums im Tierkörper ganz anders verhält, wie der hämolytische Ambozeptor in Schellers Reagenzglas-Versuchen, dagegen ähnlich wie das Komplement: seine Wirkung tritt bei Maus und Kaninchen erst bei einer gewissen annähernd gleichen Konzentration zutage; ist diese erreicht, so ist die Menge des Antigens innerhalb gewisser bei den einzelnen Tierarten etwas wechselnder Grenzen für die Schutzwirkung des Serums nicht von Belang.

Versuche mit Streptokokkenserum.

Entsprechende Versuche über die quantitativen Verhältnisse bei der Schutzwirkung des Serums haben wir auch bei der künstlichen Streptokokkeninfektion der Maus und des Kaninchens angestellt.

Wir benutzten dabei einen Streptokokkenstamm und ein spezifisches Immunserum, die uns von Herrn Dr. Aronson in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt worden waren. Später haben wir auch Proben eines im Handel käuflichen Serums herangezogen. Die Streptokokkenkultur besaß eine sehr hohe Virulenz und wuchs in Bouillon sehr viel dichter als unsere Pneumokokken; 0,0000001 ccm einer 24stündigen Kultur in 0,1% Traubenzuckerbouillon tötete ein Maus in ca. 48 Stunden bei intraperitonealer Injektion. Die Virulenz des Stammes fürs Kaninchen war ebenso maximal, doch waren die Resultate subkutaner Impfungen ähnlich wie bei den Pneu-

mokokken nicht ganz so regelmäßig wie bei der Maus; 0,0000001 ccm am Ohre subkutan injiziert tötete die Tiere aber mehrfach schon nach 22 Stunden unter dem Bilde einer septischen Allgemeininfektion mit meist sehr reichlichem Kokkengehalt des Blutes und der Organe und mehr oder weniger beträchtlicher phlegmonöser Schwellung der Impfstelle am Ohr. Die Mäuse enthielten ebenfalls sowohl im Peritoneum wie im Blut und in den Organen zahlreiche Streptokokken.

Diese Prüfungen sind bei Mäusen in mehreren Versuchen vorgenommen worden, die im folgenden zunächst dargestellt werden sollen. Bei Kaninchen haben wir es mit Rücksicht auf den großen Serumverbrauch bei einem Versuche bewenden lassen, dessen Ausfall mit den Streptokokkenversuchen an der Maus einerseits, den Pneumokokkenversuchen am Kaninchen andererseits gut übereinstimmte.

Schutzwirkung des Antistreptokokkenserums an Mäusen.

Zum Versuch wurde den Mäusen die bestimmte Serumquantität in 1 ccm Kochsalz gelöst in die Bauchhöhle gespritzt; 24 Stunden später erhielten die Tiere entsprechende Mengen einer 24stündigen Kultur in 0,1 % Traubenzuckerbouillon in unverdünntem Zustande oder mit Bouillon verdünnt unter die Rückenhaut injiziert. Zunächst verwandten wir ein karbolfreies Serum, das uns Herr Dr. Aronson überlassen hatte; so im folgenden Versuch.

Tabelle 4. Versuch vom 22. 7. 1911. Schutzwirkung des Streptokokkenserums bei Mäusen.

Menge der Kultur ccm	Vorbehandlung mit 0,2 ccm Serum	Vorbehandlung mit 0,01 ccm Serum	Vorbehandlung mit 0,002 ccm Serum	Kontrollen ohne Serum
0,1	† nach 20 Stdn.	—	—	—
0,05	† „ 20 „	† nach 20 Stdn.	† nach 20 Stdn.	—
0,01	Tier lebt		† „ 20 „	—
0,001	„ „		† „ 4 Tagen	—
			Kultur †	—
0,000 1	—		† „ 2 Tagen	
0,000 01	—	Tiere leben	† „ 2 „	—
0,000 001	—		† „ 3 „	† nach 30 Stdn.
0,000 000 1	—		Tier lebt	† „ 30 „
0,000 000 01	—		„ „	Tier lebt

Das Ergebnis dieses Versuches ist sehr bemerkenswert, indem einmal 0,002 ccm, der fünfte Teil der noch sicher schützenden Serumdosis von 0,01 ccm, fast gar keine schützende Wirkung mehr entfaltet, während andererseits die 20fach größere Serummenge, 0,2 ccm, nicht besser schützt als 0,01 ccm.

In einem anderen mit dem gleichen Serum in etwas anderer Dosierung, im übrigen aber in gleicher Weise angestellten Versuche war das Resultat weniger klar, indem hier keine so große Differenz in der Schutzwirkung der einzelnen Serumdosen zutage trat.

Tabelle 5. Versuch vom 4. 8. 1911. Schutzwirkung des Streptokokkenserums bei Mäusen.

Menge der Kultur ccm	Vorbehandlung mit 0,1 ccm Serum	Vorbehandlung mit 0,005 ccm Serum	Vorbehandlung mit 0,001 ccm Serum	Kontrollen ohne Serum
0,1	† nach 22 Stdn.	—	—	—
0,05	† „ 22 „	† nach 22 Stdn.	—	—
0,01	Tier lebt	† „ 22 „	† nach 22 Stdn.	—
0,001	„ „	† „ 22 „	† „ 22 „	—
0,000 1	—	Tiere leben	† „ 22 „	—
0,000 01	—		Tiere leben	—
0,000 001	—			† nach 22 Stdn.
0,000 000 1	—			† „ 3 Tagen

In diesem Versuche schützte also 0,1 ccm des Serums gegen die gleiche Bakterienquantität, gegen welche 0,2 und 0,01 ccm im vorher dargestellten Versuche Schutzwirkungen entfaltet hatten. Aber auch die 20- und 100fach kleineren Serumdosen übten noch gewisse Wirkungen aus; es ist demnach die Grenze des Serumeinflusses nicht so scharf und klar wie im ersten Versuche. Indessen stehen auch hier die Wirkungen dieser kleineren Dosen in keinem direkten Verhältnis zur Infektionsdosis. Die Ursache für den veränderten Ausfall dieses Versuches dürfte zum Teil in der etwas geringeren Virulenz der darin verwendeten Kultur zu suchen sein; während nämlich in der Regel 0,0000001 ccm dieses Streptokokkenstammes eine Maus in 24—48 Stunden tötete, lebte das mit dieser Dosis geimpfte Kontrolltier noch 3 Tage.

Um solche Zufälligkeiten auszuschalten, ist es jedenfalls am zweckmäßigsten, einen Versuch an einer größeren Zahl von Mäusen gleichzeitig mit derselben Bouillonkultur anzustellen. Dies ist in folgenden Versuchen geschehen (s. Tabelle 6, S. 32). Dabei gelangte ein karbolisiertes käufliches Serum (Schering) zur Verwendung. Mit jeder Serumdosis wurden je drei Mäuse vorbehandelt und nach 24 Stunden mit entsprechenden Kulturmengen infiziert. Das Resultat war ein relativ regelmäßiges und stimmte in seinem Charakter mit dem Ergebnis des in Tabelle 4 dargestellten Versuches durchaus überein; auch hier trat wieder die große Differenz zwischen der noch gute Schutzwirkungen entfaltenden Dosis von 0,01 ccm und dem gänzlichen Versagen einer nur ums 5fache kleineren Quantität deutlich zutage.

Der Tod der mit Serum vorbehandelten Tiere erfolgte vom zweiten bis zum neunten Tage nach der Infektion; die meisten Tiere gingen am dritten Tage ein. Eine gewisse Verzögerung des Todes war also erkennbar. Bei einem am siebenten Tage gestorbenen Tiere waren durch die Kultur keine Streptokokken im Blute nachzuweisen; diese Maus wurde daher als durch das Serum geschützt angesehen und dementsprechend in die Tabelle eingetragen.

Die Ergebnisse der Schutzversuche mit Streptokokkenserum an der Maus lassen sich dahin zusammenfassen, daß ähnlich wie beim Pneumokokkenserum bei einer bestimmten Serumdosis ein plötzlicher starker Abfall der Schutzwirkung zu verzeichnen ist, so daß an dieser Grenze, wie sich im ersten und dritten der mitgeteilten Versuche zeigt, schon der fünfte Teil einer Serumquantität, die noch gegen das 10000- bis 100000fache der kleinsten tödlichen

Tabelle 6. Versuch vom 11. 9. 1911. Schutzwirkung des Streptokokkenserums bei Mäusen. (Serum Schering.)

Je 3 Mäuse werden mit der gleichen Serum- und Kulturmenge gespritzt.

Menge der Kultur ccm	Vorbehandlung mit 0,01 ccm Serum	Vorbehandlung mit 0,002 ccm Serum	Vorbehandlung mit 0,001 ccm Serum	Kontrollen ohne Serum
0,05	† † †	† † †	† † †	—
0,01	† † †	† † †	† † †	—
0,001	† . .	† † †	† † †	—
0,000 1	. . .	† † .	† † .	—
0,000 01	. . .	† † †	† . .	—
0,000 001	. . .	† † .	† † .	† nach 2 Tagen
0,000 000 1	—	—	—	† „ 2 „
0,000 000 01	—	—	—	.

† = Maus an Streptokokken eingegangen.
. = Maus überlebt.

Dosis wirksam ist, fast gar keine Schutzwirkung mehr entfaltet. Bei Serummengen, die oberhalb jener wirksamen Grenzdosis liegen, tritt mit einer Zunahme der Antikörpermenge eine entsprechende Verstärkung der Schutzwirkung nicht ein; so schützte im ersten der dargestellten Versuche das 20fache der wirksamen Grenzdosis nur gegen die gleichen, nicht gegen größere Kokkenmengen. Antikörpermengen, die unterhalb des Schwellenwertes liegen, wirken nur ganz schwach und unregelmäßig, wie besonders aus dem dritten Mäuseversuch hervorgeht, in welchem die kleinste Serummenge sogar mehr Schutzeffekte erzielte, als die allerdings nur ums doppelte differierende größere Dosis. Aus diesen Resultaten ergibt sich, daß das Gesetz der Multipla bei der Wirkung des Antistreptokokkenserums im Organismus ebenfalls keinerlei Geltung hat.

Das von uns untersuchte Streptokokkenserum ist erheblich reicher an Antikörpern als das Pneumokokkenserum; es entfaltet daher im Gegensatz zum Pneumokokkenserum, das bei 0,02 ccm keinen sicheren Schutz mehr leistete, auch noch in einer Menge von 0,01 ccm eine starke spezifische Wirkung. Der Schwellenwert dieses Serums liegt für die Maus zwischen den Dosen von 0,01 und 0,002 ccm.

Schutzwirkung des Antistreptokokkenserums an Kaninchen.

Zu dem im folgenden dargestellten Schutzversuch mit Antistreptokokkenserum an Kaninchen sei bemerkt, daß es sich bei Virulenzprüfungen des Kokkenstammes, die übrigens die gleiche maximale Pathogenität der Kultur ergaben wie bei der Maus, herausstellte, daß diese Tierart ähnlich wie gegenüber den Pneumokokken, in ihrer Empfänglichkeit für die Streptokokken etwas grössere Schwankungen zeigt, indem Tiere, die mit kleineren Kulturmengen infiziert wurden, häufig früher starben als solche, die größere Dosen erhalten hatten und einzelne Tiere nach Infektionsdosen, die mit Sicherheit töten sollten, am Leben blieben. Es stand danach zu erwarten, daß sich auch bei den Schutzversuchen ähnliche Unregelmäßigkeiten zeigen würden. Das war auch der Fall, doch nur in so geringem Grade, daß uns das Ergebnis des

einen Versuches zur Beurteilung der unter diesen Bedingungen geltenden quantitativen Beziehungen zu genügen schien.

Zum Versuch wurden den ungefähr gleich großen, etwa 2000 g schweren Tieren das Serum intravenös eingespritzt, die Kultur 3 Stunden später subkutan am Ohre appliziert. Als Serum diente dieselbe karbolfreie Probe wie in Versuch 4 und 5. Zur Beurteilung des Infektionserfolges diente wie bei den Pneumokokken die erysipelatöse Schwellung des geimpften Ohres; außerdem wurden alle eingegangenen Tiere auf den Keimgehalt des Blutes durch mikroskopische und kulturelle Prüfung untersucht.

Das Ergebnis dieses Versuches am Kaninchen ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 7. Versuch vom 20. 7. 1911. Schutzwirkung des Antistreptokokkenserums beim Kaninchen.

Serumapplikation intravenös, Kultur nach 3 Stunden subkutan am Ohr.

Menge der Kultur ccm	Vorbehandlung mit 10^{-}_{0} ccm Serum	Vorbehandlung mit 1 ccm Serum	Vorbehandlung mit 0,05 ccm Serum	Vorbehandlung mit 0,01 ccm Serum	Kontrollen ohne Serum
0,1	Tier lebt	† nach 3 Tagen	† nach 2 Tagen	† nach 4 Tagen	—
0,01	„ „	Tier lebt	† „ 2 „	† „ 17 Stdn.	—
0,001	(† nach 10 Tagen; Streptokokken †)	† nach 3 Tagen	† „ 3 „	† „ 2 Tagen	—
0,000 1			† „ 6 „	† „ 3 „	—
0,000 01	Tiere leben	Tiere leben	† „ 4 „	† „ 3 „	—
0,000 001			(† „ 13 „; Streptokokken †)	Tier lebt	—
0,000 000 1			Tier lebt	† nach 7 Tagen	† nach 2 Tagen
0,000 000 01	—	—	—	Tier lebt	† „ 10 „

Auch in diesem Versuche zeigt die Schutzwirkung des Serums dasselbe Verhalten wie in den Experimenten an der Maus. Das Serum wirkt in einer Menge von 10 ccm, und, wenn auch in etwas geringerem Maße von 1 ccm stark schützend, dagegen entfaltet bereits der zwanzigste Teil dieser letzteren Antikörpermenge fast gar keine Schutzwirkungen mehr.

Also auch hier sind in der Wirkungsweise des Serums Beziehungen zum Gesetze der Multipla nicht zu erkennen. Auch hier steigen die Bakterienmengen sehr viel schneller als die Serummengen, und zwar nicht gleichmäßig, sondern derart, daß bei einer gewissen Serumquantität die Kulturdosis, gegen die sie zu schützen vermag, einen sehr viel größeren Sprung macht. Dieser Schwellenwert, d. h. die niedrigste stark wirksame Menge des Antikörpers, liegt in dem dargestellten Versuch für das Kaninchen zwischen 1 ccm und 0,05 ccm. Beim Vergleich dieser Werte mit den zu einer starken und sicheren Schutzwirkung bei der Maus erforderlichen Immunserummengen ergibt sich nach ungefährer Berechnung, daß die Serumdosen zum Körpergewicht beider Tierarten ungefähr im selben Verhältnis stehen. Nach unseren Versuchen liegt der Schwellenwert der Serumwirkung für die Maus etwa bei 0,01 ccm, für das Kaninchen bei 1 ccm; rechnet man

die Maus durchschnittlich zu 20 g, das Kaninchen zu 2000 g, so verhalten sich die Körpergewichte und die entsprechenden zum sicheren Schutz nötigen Serummengen wie 1 : 100.

Natürlich sollen diese Berechnungen auch hier wieder nur einen ungefähren Anhaltspunkt über die Wirkungsweise des Streptokokkenserums im Organismus geben, zumal die Zahl der Versuche, auf die sie sich stützen, nur gering ist.

Ähnliche Versuche hat für das Streptokokkenserum schon Aronson[1]) unternommen. Auch in seinen Versuchen trat die Abweichung der Wirkungsweise des Serums vom Gesetze der Multipla deutlich zutage; der Autor gibt an, daß im allgemeinen die zur Immunisierung nötigen Serumdosen weit langsamer steigen als die zur Infektion verwendeten Kulturmengen; man könne mit der 10 – 50fachen Serumdosis gegen die mindestens 100fach tödliche Kulturmenge und mit einer 1000fachen (aber nicht der 100fachen) Dosis gegen das 100000fache der Kultur schützen. Diese Möglichkeit, mit größeren Serumdosen gegen sehr hohe Multipla der tödlichen Bakterienmenge immunisieren zu können, sei einer der wichtigsten Unterschiede gegenüber dem Cholera- und Typhusantiserum. Bei Kaninchen fand Aronson 0,5—1,0 Serum als genügend zum Schutz gegen tödliche Infektion.

Aus der Gesamtheit unserer Schutzversuche mit Streptokokkenserum dürfte mit Sicherheit der Schluß gezogen werden können, daß es bei der Wirkung dieses Immunserums wie beim Antipneumokokkenserum in erster Linie auf den Grad seiner Konzentration in den Körpersäften und Geweben ankommt, und daß das Gesetz der Multipla bei dieser Schutzwirkung keine direkte Rolle spielt, indem die Menge des Antigens, wenn der Schwellenwert der Antikörperverdünnung erreicht ist, in gewissen Grenzen keinen nennenswerten Einfluß auf die Wirkung des Serums ausübt. Bemerkenswert ist, daß zwischen der Wirkungsweise des Strepto- und des Pneumokokkenserums weitgehende Analogien bestehen, wie es bei der nahen Verwandtschaft der beiden Mikroorganismen zu erwarten war.

Wenn die Menge des Infektionsstoffes keine große Rolle bei der Serumwirkung spielt, so ist zu erwarten, daß es auch noch einige Zeit nach der Infektion gelingt, durch nicht allzu große Serumgaben Tiere zu retten. Daß dies in der Tat der Fall ist, ist für Streptokokkenserum von Aronson (a. a. O.), für Pneumokokkenserum von Neufeld und Händel (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. 34, S. 178 u. 179) bewiesen worden.

Versuche mit Rotlaufserum.

Es war nun von Interesse für uns, zu untersuchen, ob auch gegenüber Septikämieerregern aus einer ganz anderen Bakteriengruppe eine ähnliche Gesetzmäßigkeit der Antikörperwirkung zu beobachten sein würde; wir haben daher einen septikämischen Bazillus, den Rotlauferreger, zu unseren Untersuchungen mit herangezogen. Dabei achteten wir zunächst auch auf den Infektionsmodus des Rotlauf und die

[1]) Untersuchungen über Streptokokken und Streptokokkenserum. Berl. Klin. Wochenschrift 1902, S. 979 u. 1006.

Art der Wirkung des Rotlaufimmunserums im Körper der Maus; diese Versuche sind in der vorstehenden Arbeit von Neufeld und Kandiba ausführlich mitgeteilt.

Bei der Rotlaufinfektion der Maus wuchern die Bakterien am Orte der Infektion nur in mäßigem Grade, finden sich aber bei der kulturellen Prüfung schon 15 Minuten nach der intraperitonealen Infektion im Herzblut und überschwemmen alle Organe, ohne sich jedoch so intensiv zu vermehren wie die septikämischen Kokken. Die Bakterien haben offenbar eine besondere Affinität zu den Endothelzellen und sind in und auf diesen Zellen besonders im Endokard schon in frühen Stadien der Infektion reichlich anzutreffen.

Man findet, wie wir in Übereinstimmung mit älteren Versuchen von Mesnil feststellen konnten, nach intraperitonealer Infektion in der Bauchhöhle und bei einzelnen Tieren auch im Blute Bilder sehr reichlicher Phagozytose der Bazillen durch große protoplasmareiche Zellen mit mäßig großem ovalem Kern, die wir als Endothelzellen gedeutet haben. Diese Phagozytose führt jedoch wenigstens bei größeren Infektionsdosen nicht zur Heilung, wir fanden sie bei Tieren, die später der Infektion erlagen und im Blute besonders reichlich bei moribunden Mäusen.

Dagegen haben wir bei Tieren, die nicht mit Serum vorbehandelt waren, nur ausnahmsweise eine relativ spärliche Aufnahme von Keimen durch polynukleäre Leukozyten im Peritoneum konstatieren können; diese Art der Phagozytose trat aber regelmäßig und reichlich auf bei Mäusen, die vorher mit Rotlaufserum vorbehandelt worden waren, während sie bei Tieren, die Normalserum erhalten hatten, nicht stärker war, als bei den Kontrollen ohne alles Serum. Die Phagozytose scheint mit dem Verschwinden der freien Keime aus dem Peritoneum, das sich bei den Serumtieren in etwa zwei bis drei Stunden nach der Infektion vollzieht, in direktem ursächlichem Zusammenhang zu stehen, denn Bilder von Bakteriolyse der freien Bakterien konnten wir mit Sicherheit nicht erkennen. Dagegen konnten wir eine Quellung und Abnahme der Färbbarkeit sowie eine Umbildung der Bazillen zu rundlichen Formen im Inneren der Leukozyten beobachten. Uns scheint daher die Phagozytose bei den Immunitätsvorgängen beim Rotlauf die entscheidende Rolle zu spielen und der Tropingehalt des Serums ähnlich wie bei den septikämischen Kokken für die Schutzwirkung von hoher Bedeutung zu sein. Die phagozytäre Wirkung des Serums zeigte sich übrigens auch deutlich bei Versuchen mit Meerschweinchen-Leukozyten in vitro; während die Zellen ohne Serum nur ganz ausnahmsweise einzelne Bazillen gefressen hatten, erschienen sie in den Proben mit Zusatz ganz geringer Mengen von Serum mit Bazillen dicht gefüllt; inaktives Normalpferdeserum besitzt auch eine deutliche Wirkung, aber nur in sehr viel größeren Dosen. Zur deutlichen Erkennung der oft sehr starken Phagozytose leistete uns die Färbung nach Giemsa die besten Dienste.

Zu unseren quantitativen Serumversuchen verwandten wir eine Rotlaufbouillonkultur, die, nachdem sie wenige Tierpassagen durchgemacht hatte, etwa bis 0,001 Bouillonkultur herab tötete. Die Virulenz zeigte aber gewisse Schwankungen; eine konstante höhere Virulenz wurde auch durch weitere Tierpassagen nicht erzielt. Es bestand also in dieser Beziehung ein Unterschied gegenüber den septikämischen

Kokken, deren Virulenz eine maximale war. Durch Plattenaussaat überzeugten wir uns, daß in 0,001 unserer Kultur immerhin noch über 300000 lebende Keime enthalten waren. Als Immunserum wurde eines der im Handel erhältlichen Präparate benutzt. Unsere experimentellen Versuche zur Entscheidung der quantitativen Verhältnisse bei der Rotlaufserumwirkung beziehen sich bisher nur auf die Maus.

Wir impften die Tiere mit verschiedenen Mengen des Serums subkutan und infizierten sie nach 24 Stunden mit fallenden Dosen einer achtundvierzigstündigen Bouillonkultur intraperitoneal. Das Resultat einer dieser Versuche zeigt das folgende Protokoll.

Tabelle 8. Versuch vom 24. 7. 1911. Schutzwirkung des Rotlaufimmunserums bei Mäusen.

Menge der Kultur ccm	Vorbehandlung mit 0,05 ccm Serum	Vorbehandlung mit 0,005 ccm Serum	Vorbehandlung mit 0,0025 ccm Serum	Kontrollen ohne Serum
1,0	† nach 3 Tagen	—	—	—
0,5	† „ 3 „	—	—	—
0,3	Tiere leben	† nach 6 Tagen	—	—
0,1		† „ 4 „	† nach 3 Tagen	—
0,03		Tier lebt	† „ 4 „	—
0,01		† nach 5 Tagen	† „ 4 „	—
0,003	—	Tiere leben	† „ 5 „	—
0,001	—		† „ 5 „	† nach 6 Tagen
0,000 3	—		Tier lebt	† „ 8 „
0,000 1	—		† nach 9 Tagen	† „ 8 „
0,000 01	—	—	Tier lebt	Tier lebt

Einen ganz ähnlichen Ausgang nahm eine Wiederholung des Versuches mit etwas anderen Serumdosen; das Ergebnis dieser Prüfung sei in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 9. Versuch vom 29. 7. 1911. Schutzwirkung der Rotlaufimmunserums bei Mäusen.

Menge der Kultur ccm	Vorbehandlung mit 0,05 ccm Serum	Vorbehandlung mit 0,0025 ccm Serum	Vorbehandlung mit 0,005 ccm Serum	Kontrollen ohne Serum
1,0	† nach 6 Tagen	—	—	—
0,5	Tier lebt	—	—	—
0,3	(† nach 10 Tagen)	† nach 3 Tagen	† nach 6 Tagen	—
0,1	Tier lebt	† „ 4 „	† „ 4 „	—
0,03	„ „	† „ 4 „	† „ 3 „	—
0,01	(† nach 10 Tagen)	† „ 4 „	† „ 4 „	† nach 5 Tagen
0,003	—	† „ 4 „	† „ 5 „	—
0,001	—	† „ 4 „	† „ 4 „	† nach 8 Tagen

Die Regelmäßigkeit des Ausfalles dieses Versuches wird nur durch die beiden verspäteten Todesfälle in der Reihe mit der größten Serumdosis gestört. Diese Todes-

fälle liegen aber bereits jenseits der für die Rotlaufserumprüfung von Marx festgelegten Beobachtungsfrist von acht Tagen. Die Infektion mag bei diesen beiden Tieren von Keimen ausgegangen sein, die der Serumwirkung auf irgend eine Weise entgangen waren und mag eingesetzt haben, als der Schutz bereits im Schwinden begriffen war.

Wenn man von dieser Unregelmäßigkeit absieht, so ergibt es sich, daß das Serum in einer Menge von 0,05 ccm einen starken und ziemlich sicheren spezifischen Schutz ausübt, daß die 10fach kleinere Serumdosis schon sehr viel schlechter, immerhin aber noch etwas schützt, während die 20- und 100fach kleineren Quantitäten gar keine Schutzwirkungen mehr entfalten.

Die Schutzkraft des Rotlaufserums sinkt also für den Organismus der Maus in dem engen Raume zwischen 0,05 und 0,0025 ccm von einer starken Wirkung gegenüber großen Infektionsdosen zu völligem Versagen auch gegen Bazillenmengen, die der kleinsten tödlichen Dosis nahe stehen, herab.

Dieses Ergebnis beweist, daß sich das Rotlaufimmunserum in seiner Wirkungsweise dem Pneumokokken- und Streptokokkenserum durchaus anschließt. Es wird ebenfalls in seinem Schutzeffekt von der Menge des Antigens nicht wesentlich beeinflußt, sobald es im Organismus eine gewisse Konzentration erreicht hat. Der Schwellenwert des Serums lag in unsern Versuchen in einem eng begrenzten Gebiet, da $^1/_{20}$ einer gegen enorme Dosen schützenden, dabei nach ihrer absoluten Menge sehr geringen Serumquantität auch gegen die kleinsten tödlichen Dosen gar nicht mehr wirkte. Auch bei der passiven Rotlaufimmunität steigen oder fallen die Bakterienmengen außerordentlich viel schneller als die Serumquantitäten, so daß also auch hier von einer Beziehung zu dem Gesetze der Multipla nichts zu erkennen ist.

Als bemerkenswertes Gesamtergebnis scheint uns aus den bisherigen Versuchen das eine zu folgen, daß in der Wirkungsweise der drei Immunsera weitgehende Analogien zutage treten. Die entsprechenden Mikroorganismen zeigen in ihrem Infektionsmodus alle den gleichen Typus: es handelt sich jedesmal um echte septikämische Keime, bei denen im Blut und in den Organen eine erhebliche Vermehrung stattfindet, während die Wucherung der Keime an der Infektionsstelle weniger von Bedeutung ist. Die zugehörigen Immunsera wirken nun auch alle in gleicher Weise. Sie schützen nur dann deutlich und sicher, wenn sie einen gewissen vom Körpergewicht der Tiere abhängigen Schwellenwert der Konzentration erreicht haben; ist dies eingetreten, dann ist die Menge des Infektionsstoffes relativ gleichgültig. Andrerseits wirken alle diese Sera wesentlich phagozytär, wie für das Pneumokokkenserum und das Streptokokkenserum zur Genüge sichergestellt wurde und wie wir es für das Rotlaufserum ebenfalls anzunehmen berechtigt sind.

Versuche mit Choleraimmunserum.

Es war nun von Interesse festzustellen, ob diese bei der Wirkung der Antisera gegen Septikämieerreger gefundenen quantitativen Verhältnisse auch bei Krankheitsprozessen ganz anderer Natur zutage treten würden. Wir haben daher ähnliche Unter-

suchungen bei der experimentellen Cholerainfektion des Meerschweinchens vorgenommen, die uns wegen ihres von den septikämischen Erkrankungen so weit abweichenden Charakters zu einem solchen Vergleiche besonders geeignet zu sein schien.

Die zu diesen Versuchen benutzte Kultur (Cholera 74) besaß schon, als wir mit den Experimenten begannen, eine hohe Virulenz, so daß sie, bei intraperitonealer Injektion, Meerschweinchen in einer Menge von $^1/_{80}$ Öse sicher tötete; schon nach einigen Tierpassagen war aber die Dosis letalis auf $^1/_{100}$ Öse gesunken und nach einer größeren Reihe im Verlauf eines Monats vorgenommener Passagen tötete regelmäßig $^1/_{200}$ Öse bei peritonealer Impfung.

Diese Virulenzschwankungen der Kultur scheinen auch auf die Schutzwirkung des Serums, das in allen Versuchen dasselbe war, eingewirkt zu haben, da zum Schutze im Pfeifferschen Versuch anfangs eine kleinere Serumdosis erforderlich war als in den späteren Experimenten. Diese Änderungen der Virulenz müßten nun bei der Bewertung der Resultate der im folgenden dargestellten Versuche berücksichtigt werden, so daß nur die mit gleichvirulenter Kultur angestellten Experimente verglichen werden dürften. Da aber einerseits eine Virulenzprüfung nicht bei jedem Versuche vorgenommen wurde, so daß Schwankungen von Fall zu Fall nicht ausgeschlossen werden können, da es uns anderseits ebenso wie bei den vorhergehenden Versuchen mehr auf die allgemeinen quantitativen Beziehungen zwischen dem Antigen und dem Antikörper im Organismus ankam, nicht auf feinere Einzelheiten, so sind die Virulenzunterschiede im folgenden nicht berücksichtigt und die Versuchsresultate in den Tabellen als gleichwertig berechnet worden.

Wir haben diese Kultur deswegen gewählt, weil es möglich erschien, die Infektionsdosis in ziemlich weiten Grenzen zu variieren und weil wir wenigstens nach der Seite der Virulenz hin allzu große Gegensätze zu den septikämischen Infektionserregern vermeiden wollten. Die Choleravibrionen unterscheiden sich ja auch noch in anderer Hinsicht sehr beträchtlich von den septikämischen Keimen; vor allem finden sie bei unserem Versuchstier, dem Meerschweinchen, nur in der Bauchhöhle die Bedingungen zu einer Entfaltung ihrer höchsten Virulenz, während die Septikämieerreger bei jeder Art der Applikation nahezu die gleiche Infektionstüchtigkeit beweisen. Bei intravenöser Impfung tötete unser Cholerastamm anfänglich mit $^1/_{40}$, später mit $^1/_{80}$ Öse, jedoch niemals recht regelmäßig, in den Versuchen haben wir daher bei dieser Art der Infektion nur die sicher wirkende Dosis von $^1/_{10}$ Öse angewendet. Bei subkutaner Applikation aber tötete die Kultur selbst in einer Menge von zwei Ösen nicht akut durch Infektion, sondern häufig unter dem Bilde eines chronischen Marasmus, mitunter aber überhaupt nicht. Kleinere Dosen erzeugten nach subkutaner Impfung keinerlei Krankheitserscheinungen.

Nun zeigte es sich aber, daß bei den Tieren, die einer Cholerainfektion erlegen waren, auch nach intraperitonealer Impfung fast regelmäßig eine gewisse allgemeine Verbreitung der Vibrionen im Blute und den Organen eingetreten war. Das Blut zeigte nach intraperitonealer Injektion der Vibrionen fast immer schon mikroskopisch einen bisweilen nicht unbeträchtlichen Gehalt an Keimen, in Organausstrichen war der mikroskopische Nachweis der Erreger schwieriger und vielfach negativ, doch

wurde durch die Kultur für die Milz jedesmal, für die Galle in allen untersuchten Fällen, für die Leber auch fast regelmäßig das Vorhandensein von Cholerakeimen bewiesen.

Nach intravenöser Applikation der Kultur waren diese Befunde etwas unregelmäßiger. Das Blut enthielt bei diesem Infektionsmodus weniger reichlich Vibrionen, doch gelang es fast stets, sie durch die Kultur darin nachzuweisen. Auch die Organe enthielten in der Mehrzahl der daraufhin untersuchten Fälle Vibrionen, diese fanden sich aber in keinem derselben mit besonderer Vorliebe und niemals sehr reichlich. Das Peritoneum enthielt zwar häufig mehr Keime als das Blut und die Organe, niemals aber fanden sich auch nur annähernd so große Vibrionenmengen wie nach peritonealer Impfung mit den kleinsten Dosen; in einigen Fällen, in denen die Organe bakterienfrei waren, enthielt das Peritoneum ebenfalls keine Vibrionen. Jedenfalls scheinen die Vermehrungsbedingungen im Blute für die Vibrionen viel weniger günstige zu sein wie in der Bauchhöhle; der Tod erfolgte bei intravenöser Injektion der Kultur vielleicht nur zum Teil durch eine Vermehrung der Keime, zum anderen Teil dürfte er auf direkte Giftwirkung zurückzuführen sein. Beim peritonealen Infektionsmodus war die Menge der in den Organen vorhandenen Keime nach einer Impfung mit einer und mit $^1/_{100}$ Öse etwa die gleiche. Nach intravenöser Applikation konnten wir im allgemeinen um so reichlicher Keime im Körper finden, je größer die Infektionsdosis war. Sehr regelmäßig und meist in großer Menge waren die Vibrionen in dem sanguinolenten Ödem vorhanden, das sich aus der bei der intravenösen Infektion gesetzten Wunde am Halse ansammelt, obwohl doch nur immer eine sehr geringe Menge des Infektionsmaterials ins perivaskuläre Gewebe gelangt sein konnte. Die folgende Tabelle gibt über die Vibrionenbefunde im Blute und den Organen einer Anzahl von Tieren nach intraperitonealer und intravenöser Impfung Auskunft; die Tiere waren, wie dort näher angegeben ist, zum Teil mit kleinen, nicht schützenden Mengen von Immunserum behandelt.

Tabelle 10. Verbreitung hochvirulenter Choleravibrionen im Meerschweinchenkörper nach intraperitonealer und intravenöser Injektion. + = einzelne Keime, ++ = zahlreiche, +++ = sehr zahlreiche; — = nicht untersucht.

Intraperitoneale Infektion.

Infektionsdosis	1 Öse + 0,0001 ccm Ser.	1 Öse + 0,000 05 ccm Ser.	1 Öse + 0,0001 ccm Ser.	1 Öse + 0,0002 ccm Ser.	$^1/_{20}$ Öse + 0,000 01 ccm Ser.	$^1/_{20}$ Öse	$^1/_{80}$ Öse + 0,000 001 ccm Serum	$^1/_{80}$ Öse + 0,000 005 ccm Serum	$^1/_{100}$ Öse	$^1/_{100}$ Öse	$^1/_{200}$ Öse
Lebensdauer n. d. Infektion	16 Std.	20 Std.	18 Std.	20 Std.	18 Std.	18 Std.	20 Std.	18 Std.	18 Std.	18 Std.	20 Std.
Mikroskopischer Blutbefund	+	+	+	+	++	++	++	++	+	+	+
Kultur aus Blut	+	+	++	++	++	++	++	++	+	+	+
„ „ Leber	+	+	+	+	+	++	+	+	+	0	0
„ „ Milz	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
„ „ Galle	+	+	+	+	—	—	+	++	—	—	+
„ „ Peritoneum	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Intravenöse Infektion.

Infektionsdosis	1 Öse + 0,0001 ccm Ser.	1 Öse + 0,0003 ccm Ser.	1 Öse + 0,001 ccm Ser.	1 Öse + 0,0001 ccm Ser.	1 Öse + 0,0002 ccm Ser.	1 Öse + 0,0002 ccm Ser.	1/10 Öse + 0,00001 ccm Ser.	1/10 Öse + 0,0001 ccm Ser.	1/20 Öse	1/20 Öse	1/40 Öse
Lebensdauer n. d. Infektion	20 Std.	18 Std.	10 Std.	16 Std.	24 Std.	18 Std.	18 Std.	20 Std.	16 Std.	25 Std.	48 Std.
Mikroskopischer Blutbefund	+ +	0	+ +	+ +	+ +	0	0	0	+	0	0
Kultur aus Blut	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+	+	0	+	+	+
„ „ Leber	+	+ +	+	+	+ +	0	0	0	+	0	+
„ „ Milz	+	+ +	+	+	+ +	+	+	0	+ +	0	+
„ „ Galle	+	+	0	−	+ +	+	0	0	+	−	+ +
„ „ Peritoneum	+	+	+	+	+ +	+	0	0	+ +	0	+ +

Wie sich aus den dargestellten Befunden ergibt, endet also auch die lokale Cholerainfektion mit einer allgemeinen Ausbreitung der Vibrionen im Körper. In dieser Beziehung besteht demnach eine gewisse Ähnlichkeit mit den Prozessen septikämischer Natur. Doch ist diese Erscheinung sicher ganz anders zu bewerten als die septikämische Allgemeininfektion. Während diese mit den Krankheitserscheinungen und dem schließlichen Tode der Tiere in engem ursächlichem Zusammenhange steht, ist die Cholerablutinfektion wohl mehr als eine prämortale Überschwemmung des Organismus von der überreichen Vermehrung der Keime am Orte der Infektion her aufzufassen.

Ein beachtenswerter Unterschied der septikämischen Infektionen von der experimentellen Cholera des Meerschweinchens liegt weiterhin darin, daß bei der letzteren nicht ganz selten Todesfälle zur Beobachtung gelangten, bei denen weder am Orte der Infektion, noch sonst im Organismus Vibrionen zu finden waren, eine Erscheinung, die wohl auf der Giftwirkung der zerfallenen Vibrionen beruht. Ähnliche Vorkommnisse bei Versuchen mit septikämischen Keimen dürften zu den seltenen Ausnahmen gehören. Im Experiment kann man bei Cholerainfektion auf den Unterschied zwischen Gifttod und Infektionstod, d. h. zwischen Todesfällen mit negativem und solchen mit positivem Kulturergebnis, wohl keinen zu großen Wert legen, weil der erstere sehr wohl auch nach voraufgegangener Vermehrung der Keime eintreten kann. Daher haben wir in den folgenden Berechnungen den Tod eines jeden Tieres als für das Gesamtergebnis gleichwertig angesehen.

Ein weiterer Umstand, der die Feststellung der quantitativen Verhältnisse der Immunkörperwirkung bei Choleraversuchen etwas stört, ist die Beteiligung des Komplements an dieser Wirkung; da die Mengen von Ambozeptor und Komplement, die zum Eintreten der bakteriziden Wirkung notwendig sind, sich bekanntlich gegenseitig stark beeinflussen, so muß ein verschiedener Komplementreichtum ungleiche Bedingungen für die Ambozeptorwirkung schaffen. Doch kann auch dieser Umstand an den allgemeinen Resultaten der Versuche, auf die es uns nur ankam, keinen bestimmenden Anteil gehabt haben.

Wir verfolgten in unseren Choleraversuchen die Absicht, festzustellen, wieviel Immunserum zur Schutzwirkung gegen verschiedene Mengen der Kultur erforderlich ist und wie diese quantitativen Beziehungen durch eine Änderung der Applikationsweise der Komponenten beeinflußt werden.

Schutzwirkung des Choleraserums im Pfeifferschen Versuch bei wechselnder Infektionsdosis.

Zunächst haben wir die Serumdosen bestimmt, die im Pfeifferschen Versuch zur Schutzwirkung für 1, $^1/_{20}$ und $^1/_{100}$ Öse nötig sind. Für diese wie auch für die weiteren Versuche wurde immer eine Stammemulsion der Vibrionen in Bouillon hergestellt, aus der die stärkeren Verdünnungen erst kurz vor der Mischung mit dem Serum und der Injektion bereitet wurden, um Ungenauigkeiten der Dosierung durch die Vermehrung der Keime, die bei den kleinen Vibrionenmengen viel stärker stören müßten als bei den größeren, zu vermeiden. Es wurden durchgehends 0,5 ccm der Bazillenemulsion mit 0,5 ccm der entsprechenden Serumverdünnung in Kochsalzlösung gemischt und dann alsbald verimpft. Nur einmal injizierten wir das Serum $^1/_2$ Stunde vor der Kultur, um zu prüfen, ob seine Wirkung etwa durch eine rasch einsetzende Resorption des Antikörpers aus dem Peritoneum ungünstig beeinflußt werde. Dies war aber nicht der Fall; bei dieser Versuchsanordnung erstreckte sich die Schutzwirkung des Serums bis zu der gleichen Dosis wie bei der Injektion von Kultur-Serummischungen. Demnach scheint beim Mechanismus der Schutzwirkung des Serums im Pfeifferschen Versuch die Bindung des Antikörpers an die Vibrionen in vitro keine wesentliche Rolle zu spielen und eine Verminderung der Serumwirkung durch schnelle Resorption aus dem Peritoneum nicht einzutreten.

Das Ergebnis unserer Experimente nach der Technik des Pfeifferschen Versuches war nun nicht in jedem Falle übereinstimmend. Diese Unregelmäßigkeiten mögen einmal durch die Virulenzschwankungen der Kultur, über die schon oben berichtet wurde, bedingt sein, was besonders beim Vergleich der Resultate unserer ersten, mit der noch etwas weniger virulenten Kultur angestellten Versuche und der späteren Prüfungen mit der virulenten Kultur deutlich hervorzugehen scheint. Eine andere Erklärungsmöglichkeit dieser stets in der Nähe der Wirksamkeitsgrenze des Serums liegenden Unregelmäßigkeiten dürfte darin zu suchen sein, daß der wechselnde Reichtum an normalen Abwehrkräften, vielleicht auch schon mäßige Schwankungen in der Größe der Tiere (deren Gewicht allerdings nie unter 200 und selten etwas über 250 g betragen hat), in dieser Grenzzone der Serumwirkung bei einzelnen Tieren einen bedeutenden Einfluß auf den Ausfall der Reaktion besitzen werden.

In der folgenden Tabelle ist die Mehrzahl unserer Experimente nach Pfeiffers Methode nebeneinander gestellt, um zugleich über den Grad der Unregelmäßigkeiten unserer Versuchsresultate Klarheit zu geben. In Tabelle 14 ist dann die Schutzwirkung der einzelnen Serumdosen aus der Gesamtheit der Versuche nach den Prozentzahlen der geschützten Tiere berechnet worden, in Tabelle 15 sind schließlich die Werte, die bei den verschiedenen Antigendosen und den wechselnden Applikationsmethoden noch vollen Schutz (100 % der Tiere überleben), halben Schutz (60—50 % der Tiere überleben) und keinen Schutz mehr gewährten, zum Vergleiche zusammengestellt.

Tabelle 11. Bestimmung der schützenden Dosen desselben Choleraimmunserums im Pfeifferschen Versuch beim Meerschweinchen gegenüber verschiedenen Vibrionenmengen.

I. Versuche mit 1 Öse Cholera 74.

Versuch vom 15. 5. 1911.

Serumdosis ccm	Resultat
0,000 2	Tier lebt
0,000 1	†
0,000 05	†
0,000 02	†

Versuch vom 3. 7. 1911.

Serumdosis ccm	Resultat
0,002	Tier lebt
0,000 2	†
0,000 1	†
0,000 05	†

Versuch vom 10. 7. 1911.

Serumdosis ccm	Resultat
0,002	Tier lebt
0,001	„ „
0,000 5	†
0,000 2	†

Versuch vom 7. 9. 1911.

Serumdosis ccm	Resultat
0,001	Tier lebt
0,000 5	†
0,000 2	†
0,000 1	†

Versuch vom 16. 9. 1911.

Serumdosis ccm	Resultat
0,001	Tier lebt
0,000 5	„ „
0,000 2	†
0,000 1	†

Versuch vom 23. 9. 1911 (doppelte Reihe).

Serumdosis ccm	Resultat
0,001	Tiere leben
0,000 5	„ „
0,000 2	† †
0,000 1	† †

Versuch vom 24. 9. 1911.

Die intraperitoneale Serumapplikation erfolgte $^1/_2$ Stunde vor der Injektion der Vibrionen.

Serumdosis ccm	Resultat
0,002	Tier lebt
0,001	„ „
0,000 5	„ „
0,000 2	†

II. Versuche mit $^1/_{20}$ Öse Cholera 74.

Versuch vom 19. 5. 1911.

Serumdosis ccm	Resultat
0,000 1	Tier lebt
0,000 05	„ „
0,000 02	†
0,000 01	†

Versuch vom 6. 7. 1911.

Serumdosis ccm	Resultat
0,000 1	Tier lebt
0,000 05	†
0,000 02	†
0,000 01	†

III. Versuch mit $^1/_{100}$ Öse Cholera 74.

Versuch vom 29. 9. 1911 (doppelte Reihe).

Serumdosis ccm	Resultat
0,000 02	Tiere leben
0,000 01	„ „
0,000 005	1 Tier lebt, 1 †
0,000 002	† †

Aus der Gesamtheit der Ergebnisse dieser Versuche, die in den Tabellen 14 und 15 nochmals zusammengefaßt sind, geht das eine sogleich mit Sicherheit hervor, daß bei der Schutzwirkung des Choleraserums engere Beziehungen zwischen der Menge des Antigens und des Antikörpers bestehen, wie bei der Wirkung des Immunserums gegenüber den septikämischen Keimen. Diese Beziehungen sind noch enger als wir in unserer früheren Mitteilung auf Grund der ersten dort mitgeteilten Versuche annahmen; nach der Gesamtheit unserer Ergebnisse liegen die Verhältnisse im Pfeifferschen Versuch beim Choleraserum derartig, daß die Annahme der Gültigkeit des Gesetzes der multiplen Proportionen sehr viel für sich hat. Vergleicht man nämlich die Serummengen, die zum sicheren Schutze gegen 1, $^1/_{20}$ und $^1/_{80}$ resp. $^1/_{100}$ Öse nötig sind, so verhalten sie sich wie $1 : {}^1/_{10} : {}^1/_{100}$; dasselbe ist beim Vergleich der Dosen, die für einen halben Schutz hinreichen, der Fall, während beim Vergleich der Werte, die keinen Schutz mehr gewährten, ein Verhältnis wie $1 : {}^1/_5 : {}^1/_{50}$ zutage tritt. Die Serumdosen steigen und fallen also hier etwa im selben Verhältnis wie die Kulturdosen; doch muß man bedenken, daß den kleinsten Vibrionenquantitäten gegenüber die normalen Serumschutzstoffe einen Anteil an der Schutzwirkung haben können, während ihr Einfluß bei den großen Dosen ganz zurücktreten muß. Es ist also den kleinen Infektionsdosen gegenüber wohl etwas mehr Immunkörper erforderlich, als es nach dem direkten Versuchsergebnis erscheinen möchte. Aber auch nach Berücksichtigung dieser Verhältnisse ist die Parallelität der Serum- und Infektionsdosen ganz auffallend und die Resultate lassen sich keinesfalls mit den bei den Schutzversuchen gegen die Septikämieerreger erhaltenen vergleichen, bei denen ja zwischen der Menge der Antikörper und des Antigens direkte Beziehungen überhaupt nicht zu bestehen schienen.

Versuche mit intravenöser Injektion des Choleraserums und intraperitonealer Infektion.

Bei den von uns bisher untersuchten Antiseris gegen Septikämieerreger hatte ferner die Applikationsart des Serums auf seine Wirksamkeit keinen wesentlichen Einfluß; die Sera schützten etwa gleich gut, wenn sie an derselben, als wenn sie an einer anderen Körperstelle wie die Kultur gegeben wurden. Sofern nur nicht ungünstige Resorptionsbedingungen wie bei der subkutanen Applikation bei Kaninchen hemmend wirkten, erreichte die Schutzkraft des Serums bei jeder Applikationsart etwa den gleichen Wert.

Zur Prüfung, ob das Choleraserum ein ähnliches Verhalten zeigen werde, haben wir nun zu bestimmen versucht, wieviel Serum bei intravenöser Applikation notwendig ist, um gegen die intraperitoneale Infektion mit 1 und $^1/_{20}$ sowie $^1/_{80}$ bezw. $^1/_{100}$ Öse zu schützen.

Zur Technik der Versuche sei bemerkt, daß wir das Serum den Meerschweinchen in 1 ccm Kochsalzlösung in die Jugularvene injizierten und durchschnittlich nach zwei, in einigen Versuchen auch erst nach drei, in einem Falle schon nach $^1/_2$ Stunde die Kulturmenge intraperitoneal verimpften. Ein wesentlicher Unterschied in der Wirkungsweise des Serums entsprechend einer längeren oder kürzeren Zwischenzeit war nicht festzustellen.

Der Mechanismus der Serumwirkung war bei dieser Versuchsanordnung der mikroskopischen Beobachtung zufolge durchaus der gleiche wie beim Pfeifferschen Versuch. Auch hier erfolgte bei Tieren, die eine genügende Serumdosis erhalten hatten, eine prompte Auflösung der Vibrionen unter Bildung typischer Granula; der Prozeß war meist in einer Stunde abgelaufen.

Das Ergebnis dieser Versuche war nun weit unregelmäßiger wie bei der Versuchsanordnung nach Pfeiffer. Wahrscheinlich beruht das darauf, daß die Resorptions- und Exsudationsverhältnisse nach der intravenösen Injektion des Serums bei den einzelnen Tieren doch erheblicheren Schwankungen unterliegen; auch mögen bei dieser Versuchsanordnung Unterschiede in der Größe der Tiere stärker zur Geltung kommen.

In der folgenden Tabelle mögen wiederum unsere Versuche in ihrer Gesamtheit zur Darstellung gelangen.

Tabelle 12. Bestimmung der schützenden Dosen unseres Choleraimmunserums bei intraperitonealer Applikation der Kultur, intravenöser Injektion des Serums, gegenüber verschiedenen Vibrionenmengen.

I. Versuche mit 1 Öse.

Versuch vom 19. 5. 1911.

Serumdosis ccm	Resultat
0,5	Tier lebt
0,2	„ „
0,05	†
0,02	†
0,002	†
0,000 2	†

Versuch vom 2. 6. 1911.

Serumdosis ccm	Resultat
0,2	Tier lebt
0,02	„ „

Versuch vom 3. 6. 1911.

Serumdosis ccm	Resultat
0,02	†
0,002	†
0,000 2	†

Versuch vom 30. 6. 1911.

Serumdosis ccm	Resultat
0,5	Tier lebt
0,3	„ „
0,2	„ „
0,05	†
0,02	†
0,002	†

Versuch vom 3. 7. 1911.

Serumdosis ccm	Resultat
1,0	Tier lebt
0,5	„ „
0,2	„ „
0,05	†
0,02	Tier lebt

Versuch vom 18. 9. 1911.

Serumdosis ccm	Resultat
0,2	Tier lebt
0,05	„ „
0,02	„ „
0,01	†

Versuch vom 19. 9. 1911.

Serumdosis ccm	Resultat
0,2	Tier lebt
0,05	„ „
0,01	†

Versuch vom 23. 9. 1911. (Injektion der Kultur nach $^1/_2$ Stunde.)

Serumdosis ccm	Resultat
0,5	Tier lebt
0,2	„ „
0,05	„ „
0,01	†

II. Versuche mit $^1/_{20}$ Öse.

Versuch vom 19. 5. 1911.

Serumdosis ccm	Resultat
0,02	Tier lebt
0,002	„ „
0,000 2	„ „
0,000 05	†

Versuch vom 2. 6. 1911.

Serumdosis ccm	Resultat
0,2	Tier lebt
0,02	„ „
0,002	„ „

Versuch vom 3. 6. 1911.

Serumdosis ccm	Resultat
0,02	Tier lebt
0,002	„ „
0,000 2	„ „
0,000 05	†

Versuch vom 7. 7. 1911.

Serumdosis ccm	Resultat
0,05	Tier lebt
0,02	„ „
0,002	†
0,000 2	†
0,000 05	†

Versuch vom 8. 7. 1911.

Serumdosis ccm	Resultat
0,05	Tier lebt
0,02	„ „
0,002	†
0,000 2	†
0,000 05	†

Versuch vom 10. 7. 1911.

Serumdosis ccm	Resultat
0,01	Tier lebt
0,005	„ „

Versuch vom 18. 9. 1911.

Serumdosis ccm	Resultat
0,01	Tier lebt
0,002 5	„ „
0,001	„ „
0,000 5	„ „

Versuch vom 19. 9. 1911.

Serumdosis ccm	Resultat
0,01	Tier lebt
0,002 5	„ „
0,000 5	†
0,000 1	†

III. Versuche mit $^1/_{80}$ Öse.

Versuch vom 30. 6. 1911.

Serumdosis ccm	Resultat
0,002	Tier lebt
0,000 2	†
0,000 02	†
0,000 002	†

Versuch vom 7. 9. 1911.

Serumdosis ccm	Resultat
0,01	Tier lebt
0,002 5	„ „
0,000 5	„ „
0,000 1	†

IV. Versuch mit $^1/_{100}$ Öse.

Versuch vom 18. 9. 1911.

Serumdosis ccm	Resultat
0,002	Tier lebt
0,000 5	„ „
0,000 2	„ „
0,000 1	„ „
0,000 05	†

Aus den hier dargelegten und in den Tabellen 14 und 15 zusammengefaßten Versuchsergebnissen geht zunächst hervor, daß bei intravenöser Applikation erheblich mehr Serum erforderlich ist als im Pfeifferschen Versuch. Zum sicheren Schutze gegen 1 Öse war etwa 200 mal mehr Serum nötig, als bei gleichzeitiger peritonealer Injektion von Antigen und Antiserum. Anderseits versagte die Schutzwirkung bei intravenöser Einspritzung des Serums noch bei dem 100fachen Multiplum der im Pfeifferschen Versuch nicht mehr schützenden Menge.

Mithin liegen die Verhältnisse beim Mechanismus der Schutzwirkung des Choleraserums ganz anders wie bei den Immunseris gegen die Septikämieerreger. Während bei diesen letzteren eine allgemeine Verbreitung der Schutzstoffe im Organismus für die Schutzwirkung notwendig sein dürfte, scheinen bei der Cholerainfektion die im Blute und in den Organen enthaltenen Antikörper für den Ausgang der Infektion keine große Bedeutung zu haben. Es kommt dafür offenbar nur der Teil in Betracht, der beim Einsetzen der Infektion in der Bauchhöhle vorhanden ist oder noch vor der Entscheidung des Kampfes dorthin gelangt. Von dem Zeitraum, der bis zur Entscheidung des Ausganges der Infektion vergeht, muß es also abhängen, ob die im Blute kreisenden Antikörper an dem Kampfe im Peritoneum in erheblicherem Grade Anteil nehmen oder nicht.

Darin scheint uns die Erklärung für die bemerkenswerte Erscheinung zu liegen, daß bei dieser Versuchsanordnung das Gesetz der Multipla nicht strenge Geltung hat, daß vielmehr bei den kleinen Infektionsdosen relativ weniger Serum zum Schutze erforderlich war als bei 1 Öse. Zum sicheren Schutze gegen $^1/_{20}$ Öse genügte der 80. Teil der Dosis, die gegen 1 Öse schützte und für $^1/_{80}$ bezw. $^1/_{100}$ Öse war nur der 400. Teil jener Menge nötig. Ähnlich liegen die Verhältnisse für die Dosen, bei denen noch ein halber Schutz eintrat, und für die obere Grenze des Versagens der Schutzwirkung, wie aus Tabelle 15 ersichtlich ist.

Diese Verhältnisse scheinen uns, abgesehen von der größeren Unregelmäßigkeit, die dieser Versuchsanordnung anhaftet, in erster Linie mit der relativ ungleichen Vermehrung der großen und der kleinen Vibrionenmengen zusammenzuhängen. Offenbar geht die Vermehrung der in 1 Öse enthaltenen Keime so schnell von statten, daß, wenn im Momente der Infektion in der Bauchhöhle nicht die genügende Antikörpermenge vorhanden ist und die Vermehrung der Vibrionen hemmt, die Zahl der Keime in kurzer Zeit eine so große geworden ist, daß eine Rettung des Tieres bald unmöglich wird. Bei den kleineren Dosen dauert es offenbar länger, bis die Bakterien zu einer nicht mehr zu überwindenden Masse angewachsen sind; der Organismus hat hier Zeit, auf die Infektion mit einer stärkeren Exsudation von Serum zu antworten und damit gelangt ein Teil der im Blute kreisenden Immunstoffe an den Ort des Kampfes. Es kommen so gewiß auch Normalschutzstoffe in vermehrter Menge ins Peritoneum, denen sicher auch ein Anteil an dem Siege des Organismus gegenüber den kleinen Infektionsdosen zukommt. Indessen müßten diese ja auch bei der Anordnung des Pfeifferschen Versuches zur gleichen Wirkung gelangen; durch die Tätigkeit dieser normalen Schutzstoffe dürften demnach die Unterschiede der Ver-

suchsergebnisse bei intraperitonealer und bei intravenöser Zuführung des Serums den kleinen Infektionsdosen gegenüber nicht erklärt werden können.

Jedenfalls liegen bei der Cholerainfektion in dieser Versuchsanordnung die Verhältnisse gerade umgekehrt wie bei der Infektion mit septikämischen Keimen; bei diesen erforderten kleinere Bakteriendosen relativ sehr große Serummengen zur Schutzwirkung, hier ist den kleineren Mengen gegenüber unter Umständen sogar weniger Serum nötig, als nach dem Gesetz der Multipla erforderlich sein würde; diese Abweichung dürfte aber nur eine scheinbare und dadurch verursacht sein, daß bei dem langsameren Verlauf einer Injektion mit kleinerer Dosis einer größeren Menge der im Blute kreisenden Antikörper Gelegenheit geboten wird, in den Prozeß einzugreifen.

Versuche mit gleichzeitiger intravenöser Injektion von Choleraserum und Kultur.

Wir haben nun zur Prüfung der quantitativen Beziehungen zwischen Choleraantikörper und Antigen noch eine dritte Versuchsanordnung herangezogen, die durch die Fähigkeit der Kultur auch bei intravenöser Injektion zu infizieren, ermöglicht wurde: die gleichzeitige intravenöse Verimpfung der Vibrionen und des Serums. Obwohl die Kultur bei dieser Applikation mehrfach noch in der Menge von $^1/_{40}$ und $^1/_{80}$ Öse tötete, haben wir, da diese Dosen kein ganz sicheres Infektionsresultat ergaben, nur die mit Sicherheit tötenden Mengen von 1 und $^1/_{10}$ Öse zu den Versuchen verwendet. Zur Technik dieser Experimente sei bemerkt, daß die Mischungen in genau derselben Weise hergestellt wurden wie zu den Pfeifferschen Versuchen; darauf wurden sie in üblicher Weise in die freigelegte Jugularvene gespritzt. Die Krankheitserscheinungen waren bei nicht geschützten Tieren nach intravenöser Infektion dieselben wie nach intraperitonealer Impfung, auch trat der Tod etwa in der gleichen Zeit ein; über die bakteriologischen Befunde nach intravenöser Injektion ist oben berichtet worden.

Die Resultate dieser allerdings nicht sehr zahlreichen Versuche waren regelmäßiger als bei getrennter Applikation von Antigen und Antikörper; sie sind in Tabelle 13 kurz dargestellt.

Tabelle 13. Bestimmung der schützenden Dosen unseres Choleraimmunserums am Meerschweinchen bei gleichzeitiger intravenöser Applikation von Antigen und Antiserum gegenüber verschiedenen Vibronenmengen.

I. Versuche mit 1 Öse.

Versuch vom 29. 7. 1911.		Versuch vom 7. 9. 1911.		Versuch vom 3. 10. 1911.	
Serumdosis ccm	Resultat	Serumdosis ccm	Resultat	Serumdosis ccm	Resultat
0,05	Tier lebt	0,01	Tier lebt	0,01	Tier lebt
0,02	„ „	0,002	†	0,002	†
0,01	„ „	0,000 5	†	0,001	†
0,002	„ „			0,000 5	†
0,001	†				
0,000 1	†				

II. Versuche mit $^1/_{10}$ Öse.

Versuch vom 29. 7. 1911.		Versuch vom 7. 9. 1911.		Versuch vom 3. 10. 1911.	
Serumdosis ccm	Resultat	Serumdosis ccm	Resultat	Serumdosis ccm	Resultat
0,02	Tier lebt	0,005	Tier lebt	0,005	Tier lebt
0,01	„ „	0,001	„ „	0,001	„ „
0,001	„ „	0,000 2	†	0,000 5	„ „
0,000 1	†			0,000 2	†

Aus den Versuchsergebnissen geht hervor, daß auch bei gleichzeitiger intravenöser Applikation eine größere Serummenge zur Schutzwirkung erforderlich ist als bei der Anordnung des Pfeifferschen Versuches; die Bedingungen für eine erfolgreiche Serumwirkung sind also weniger günstig. Zum sicheren Schutze gegen 1 Öse bedurfte es der etwa 10fachen Serummenge, ebenso trat das Versagen der Schutzwirkung schon bei einer 10fach größeren Dosis ein als im Pfeifferschen Versuch. Bei der Infektion mit $^1/_{10}$ Öse ist zum sicheren Schutze der 10. bis 20. Teil der für eine Öse ausreichenden Antikörperquantität erforderlich, während das Versagen der Schutzwirkung beim 5. bis 10. Teile der Serumdosis eintritt, die bei 1 Öse nicht mehr schützt. Bei dieser Versuchsanordnung, bei der keine räumliche Trennung der Komponenten die Bindung des Antikörpers an das Antigen hemmt, treten also die annähernd proportionalen quantitativen Verhältnisse zwischen den beiden Reaktionskörpern klar hervor.

In den beiden folgenden Tabellen (S. 49 und 50) geben wir eine Übersicht und Zusammenfassung aller unserer Versuche mit Cholera.

Allgemeine Ergebnisse der Versuche.

Fassen wir die Unterschiede, die sich aus einem Vergleich der Infektion mit Choleravibrionen und der Wirkungsweise des Choleraantikörpers einerseits, der septikämischen Prozesse und der entsprechenden Immunsera anderseits ergeben, zusammen, so sehen wir bei den letzteren Keimen eine maximale (Pneumokokken, Streptokokken) oder doch sehr erhebliche Virulenz (Rotlauf), mit der sich die hohe Infektiosität unserer Cholerakultur immerhin nicht vergleichen läßt; wir sehen bei den Septikämieerregern eine nahezu gänzliche Unabhängigkeit von der Beschaffenheit des Gewebes, in dem die Infektion gesetzt wird, während die Choleravibrionen im Peritoneum in unvergleichlich höherem Grade als im Blute oder gar im Subkutangewebe zu wachsen vermögen. Bei den septikämischen Keimen sehen wir eine mehr oder weniger allmähliche Entwicklung des Krankheitsprozesses ohne vorzugsweise Vermehrung der Keime am Orte der Infektion, bei den Cholerakeimen eine sehr akut verlaufende Erkrankung mit rapid einsetzender massenhafter Wucherung der Keime an der Infektionsstelle. Bei beiden Infektionsarten findet eine allgemeine Verbreitung der Keime in die Blutbahn und die Organe statt, aber bei den septikämischen Krankheiten ist sie das Wesentliche, bei der Cholera wohl nur ein Nebenbefund.

Tabelle 14. Zusammenstellung des Gesamtergebnisses und Bewertung des Schutzeffektes nach der Prozentzahl der geschützten Tiere.

A. Pfeifferscher Versuch.

1 Öse.			$^1/_{20}$ Öse.			$^1/_{100}$ Öse.		
Serumdosis ccm	Zahl der Tiere	%-Zahl der überlebenden	Serumdosis ccm	Zahl der Tiere	%-Zahl der überlebenden	Serumdosis ccm	Zahl der Tiere	%-Zahl der überlebenden
0,002	3	100	0,000 1	2	100	0,000 02	2	100
0,001	5	100	0,000 05	2	50	0,000 01	2	100
0,000 5	5	60	0,000 02	2	0	0,000 005	2	50
0,000 2	7	14	0,000 01	2	0	0,000 002	2	0
0,000 1	5	0						
0,000 05	2	0						
0,000 02	1	0						

B. Intravenöse Serumapplikation, intraperitoneale Kulturinjektion.

1 Öse.			$^1/_{20}$ Öse.			$^1/_{80}$ und $^1/_{100}$ Öse zusammengerechnet.		
Serumdosis ccm	Zahl der Tiere	%-Zahl der überlebenden	Serumdosis ccm	Zahl der Tiere	%-Zahl der überlebenden	Serumdosis ccm	Zahl der Tiere	%-Zahl der überlebenden
1,0	1	100	0,2	1	100	0,01	1	100
0,5	4	100	0,05	2	100	0,002 5	1	100
0,3	1	100	0,02	5	100	0,002	2	100
0,2	7	100	0,01	3	100	0,000 5	2	100
0,05	6	50	0,005	1	100	0,000 2	2	50
0,02	6	50	0,002 5	2	100	0,000 1	2	50
0,01	3	0	0,002	5	60	0,000 05	1	0
0,002	3	0	[0,001	1	100]	0,000 02	1	0
0,000 2	2	0	0,000 5	2	50	0,000 002	1	0
			0,000 2	4	50			
			0,000 1	1	0			
			0,000 05	4	0			

C. Gleichzeitige intravenöse Kultur- und Seruminjektion.

1 Öse.			$^1/_{10}$ Öse.		
Serumdosis ccm	Zahl der Tiere	%-Zahl der überlebenden	Serumdosis ccm	Zahl der Tiere	%-Zahl der überlebenden
0,05	1	100	0,02	1	100
0,02	1	100	0,01	1	100
0,01	3	100	0,005	2	100
0,002	3	33	0,001	3	100
0,001	2	0	0,000 5	1	100
0,000 5	2	0	0,000 2	2	0
0,000 1	1	0	0,000 1	1	0

Tabelle 15. Übersichtstabelle über die Gesamtergebnisse der Versuche mit Choleravibrionen.

Schutzwirkung	Infektionsdosen	I. Serummengen beim Pfeifferschen Versuch	II. Serummengen bei intravenöser Serum-, intraperitonealer Kulturapplikation	Mengenverhältnis zu den entsprechend. Serumdosen i. Pfeifferschen Versuch	III. Serummengen bei gleichzeitiger intravenöser Injektion von Kultur u. Serum	Mengenverhältnis zu den entsprechend. Serumdosen i. Pfeifferschen Versuch
Untere Grenzen des sicheren Schutzes (100% überlebend. Tiere)	1 Öse	0,001 [= 1]	0,2 [= 1]	200 : 1	0,01 [= 1]	10 : 1
	$^1/_{20}$, bei III. $^1/_{10}$ Öse	0,0001 [= $^1/_{10}$]	0,0025 [= $^1/_{80}$]	25 : 1	0,0005 [= $^1/_{20}$]	5 : 1
	$^1/_{80}$ u. $^1/_{100}$ Öse	0,00001 [= $^1/_{100}$]	0,0005 [= $^1/_{400}$]	50 : 1	—	—
Durchschnittswerte für halben Schutz (50—60% überlebende Tiere)	1 Öse	0,0005 [= 1]	0,035 [= 1]	70 : 1	—	—
	$^1/_{20}$ Öse	0,00005 [= $^1/_{10}$]	0,0011 [= $^1/_{32}$]	22 : 1	—	—
	$^1/_{80}$ u. $^1/_{100}$ Öse	0,000005 [= $^1/_{100}$]	0,00015 [= $^1/_{233}$]	30 : 1	—	—
Obere Grenze des Versagens der Schutzwirkung (0%)	1 Öse	0,0001 [= 1]	0,01 [= 1]	100 : 1	0,001 [= 1]	10 : 1
	$^1/_{20}$, bei III. $^1/_{10}$ Öse	0,00002 [= $^1/_{5}$]	0,0001 [= $^1/_{100}$]	5 : 1	0,0002 [= $^1/_{5}$]	10 : 1
	$^1/_{80}$ u. $^1/_{100}$ Öse	0,000002 [= $^1/_{50}$]	0,00002 [= $^1/_{500}$]	10 : 1	—	—

Dieser Differenz im Charakter der Infektionen gehen Unterschiede der quantitativen Beziehungen zwischen den Antiseris und den Antigenen parallel, die dahin zusammengefaßt werden können, daß bei der Schutzwirkung der gegen die Septikämieerreger gerichteten Sera keine Beziehungen zur Menge des Infektionsmaterials innerhalb ziemlich weiter Grenzen bestehen, wohl aber deutliche Beziehungen zur Körpermasse des zu schützenden Tieres, indem das Serum erst dann gute Schutzwirkungen zu entfalten beginnt, wenn es überall im Organismus einen gewissen Konzentrationsgrad erreicht hat. Beim Choleraserum bestehen dagegen enge quantitative Beziehungen des Antigens zum Antikörper, die, wenn keine ungleiche räumliche Verteilung die Bindung beider Komponenten hemmt, den Charakter des Gesetzes der multiplen Proportionen annehmen, dagegen, wenn das Choleraantigen auf ein begrenztes Gebiet lokalisiert, der Antikörper allgemein verteilt ist, ein komplizierteres Verhalten zeigen, das aber wieder völlig von dem bei den septikämischen Erregern gefundenen Verhalten abweicht: es wachsen bezw. fallen die Serummengen in diesem

Falle schneller als die Infektionsdosen. Für diese Abweichung vom Gesetz der Multipla haben wir oben eine Erklärung zu geben versucht.

Wie sind nun die Unterschiede der quantitativen Beziehungen bei der Wirkung dieser Immunsera im Körper der Versuchstiere aufzufassen? Kommt hierfür vielleicht hauptsächlich die Art der Antikörper in Betracht?

Beim Vergleich der Wirkungsweise der entsprechenden Antisera sehen wir auf der einen Seite, bei Cholera, eine rein oder doch ganz überwiegend bakteriolytische Immunität eintreten, während auf der anderen Seite phagozytäre Prozesse hervorgerufen werden, wie sie für das Pneumokokken- und Streptokokokkenserum von vielen Seiten als das ausschlaggebende Moment festgestellt, für das Rotlaufserum von uns ebenfalls nachgewiesen worden sind.

Trotz dieses prinzipiell verschiedenen Wirkungsmechanismus scheinen uns die beobachteten Differenzen in den quantitativen Verhältnissen der Antikörperwirkung dennoch weniger in der Natur der Antikörper als im Charakter der Infektionsprozesse begründet zu sein. Vielleicht kann man sich vorläufig etwa folgende Vorstellungen darüber machen:

Es ist von vornherein wahrscheinlich, daß sowohl für einen Choleravibrio wie für einen septikämischen Keim eine bestimmte Menge eines Antiserums von bestimmter Wertigkeit zur genügenden „Sensibilisierung" erforderlich ist. Finden nun die Vibrionen am Orte der Infektion diese notwendige Serummenge, so nimmt die Infektion unter rapider Auflösung der Keime ein rasches Ende. Eine Verschleppung des Prozesses durch einzelne Vibrionen, die der Serumwirkung auf irgend eine Weise entgehen, kann nicht erfolgen, da diese versprengten Keime durch die normalen Schutzkräfte des Organismus sicher vernichtet werden. Bei den Septikämieerregern ist aber eine derartige Verbreitung der Infektion durch einzelne überlebende Keime sehr wohl möglich, da bei ihrer maximalen Virulenz schon wenige Keime genügen, um den Prozeß an anderen Stellen des Organismus wieder aufflammen zu lassen, falls dort nicht auch die für die Sensibilisierung notwendige Antikörpermenge vorhanden ist.

Während also bei der experimentellen Cholerainfektion vorzugsweise die am Orte der Infektion vorhandenen oder dorthin sezernierten Antikörper für die Vernichtung der Keime in Betracht kommen, spielt bei den septikämischen Infektionen, bei denen jede Stelle des Organismus zum Ausgangspunkte eines neuen Schubes der Infektion werden kann, gerade diese allgemeine Durchtränkung des Körpers mit den Immunstoffen die Hauptrolle.

Diese Verteilung der Immunsubstanzen muß nun, wenn der Schutz ein sicherer sein soll, einen solchen Grad erreichen, daß jeder kleine Bezirk, der zum Ansiedlungsbereich für einen der septikämischen Keime werden kann, die zu dessen Sensibilisierung notwendige Antikörpermenge besitzt. Andernfalls wird es bei der enormen Virulenz der Keime keinen großen Unterschied ausmachen, ob wenige oder viele der Sensibilisierung und Vernichtung entgehen; das Resultat wird also bei ungenügender Durchtränkung des Organismus mit Antikörpern nach Infektion mit einer großen und einer kleinen Bakterienmenge gleich ungünstig sein.

Bei den septikämischen Prozessen kommt es also auf die Zahl der mit den Immunsubstanzen in genügendem Grade zu imprägnierenden Körperbezirke an, daher spielt das Gewicht des zu schützenden Tieres eine ganz wesentliche Rolle bei der Immunisierung.

Obwohl also nichts dagegen spricht, daß bei den septikämischen Prozessen der Antikörper den Keimen gegenüber im Grunde ebenfalls nach der absoluten Menge wirkt, richtet sich doch seine Schutzwirkung für den Organismus durchaus nach dem Grade seiner Verteilung in den Geweben, nach seiner Konzentration. Bei der experimentellen Cholerainfektion spielt dagegen die Körpermasse nach intravenöser Zufuhr des Serums nur die Rolle eines Verdünnungsmittels, das dem lokal bleibenden Prozeß einen großen Teil der Antikörper entzieht. Hier kommen nur die an den Ort der Infektion gelangenden Immunstoffe zur Wirkung. Wird der verdünnende Einfluß der Körpermasse durch eine lokale Serumapplikation am Ort der Infektion ausgeschaltet, so vollzieht sich der Prozeß ähnlich wie im Reagenzglase, die Reaktion zwischen den Komponenten verläuft nach der absoluten Menge und folgt daher annähernd dem Gesetze der Multipla.

Es wäre nun von hohem Interesse, zu untersuchen, wie die quantitativen Verhältnisse zwischen Antigen und Antikörper bei einem Vibrio liegen, der nach dem Charakter der durch ihn bedingten Infektionen den Septikämieerregern näher zu stehen scheint. Untersuchungen nach dieser Richtung haben wir mit dem Vibrio Metschnikow begonnen, der einerseits für Meerschweinchen und Tauben als echter Septikämieerreger beschrieben wird, während anderseits als Immunstoffe überwiegend bakteriolytische in Betracht kommen sollen; die von uns bisher geprüften Kulturen waren jedoch nicht genügend virulent.

B. Versuche in vitro.

Aus unseren Schutzversuchen mit Immunseris ergab sich, daß im tierischen Organismus zwischen dem antibakteriellen Immunkörper und dem Antigen entweder überhaupt keine quantitativen Beziehungen zu bestehen scheinen, wie bei den Septikämieerregern, oder daß diese Beziehungen, wo sie zu erkennen sind, wie bei den Schutzversuchen mit Choleravibrionen, durch die Verteilung des Antikörpers in den Körpersäften erheblich beeinflußt werden.

Da nun aber der Organismus für den Verlauf der Bindung beider Komponenten kein genügend indifferentes Medium ist, so schien es notwendig, diese Befunde durch analoge Untersuchungen im Reagenzglase zu ergänzen. Wir haben daher diese Verhältnisse auch in vitro einer näheren Prüfung unterzogen und sind dabei zunächst den oben erwähnten Befunden Schellers nachgegangen, denen zufolge das Komplement nach der Verdünnung, der Ambozeptor nach der absoluten Menge wirkt. Dann haben wir die quantitative Wirkungsweise besonders der thermostabilen phagozytären Antikörper geprüft und kamen dabei auf gewisse Schwierigkeiten, deren Studium zu Resultaten führte, die vielleicht auch in etwas zur Erklärung des Unterschiedes der Antikörperwirkung im Reagenzglas und im Tierkörper beitragen könnten.

Untersuchungen über die Wirkungsweise des Komplements.

Wir untersuchten zunächst die Wirkungsweise des Komplements und benutzten dabei, wie Scheller, den Hämolyseversuch. Wir gingen so vor, daß in einer doppelten Versuchsreihe zu gleichen Mengen des Ambozeptors (0,001 Kaninchenantihammelblutserum in 1 ccm Kochsalzlösung) und des Antigens (1 ccm 5 % gewaschenes Hammelblut) fallende Mengen frischen Meerschweinchenkomplements in wechselnden Flüssigkeitsmengen zugesetzt wurden, so daß in der ersten Reihe das Gesamtvolumen 3 ccm, in der zweiten 30 ccm betrug, während die absolute Komplementmenge in der ersten und zweiten Reihe die gleiche war. Das Resultat eines solchen Versuches zeigt das folgende Protokoll.

Tabelle 16. Versuch vom 15. 3. 1911. Wirkung des hämolytischen Komplements auf gleich stark sensibilisierte Blutkörperchen in wechselnden Verdünnungen.

Gesamtvolumen 3 ccm			Gesamtvolumen 30 ccm		
Komplementmenge ccm	Komplementverdünnung	Resultat	Komplementmenge ccm	Komplementverdünnung	Resultat
1	1 : 3	komplette Hämolyse	1	1 : 30	komplette Hämolyse
0,3	1 : 10	„	0,3	1 : 100	„
0,1	1 : 30	„	0,1	1 : 300	„
0,03	1 : 100	„	0,03	1 : 1000	0
0,01	1 : 300	fast komplett	0,01	1 : 3000	0
0,003	1 : 1000	fast 0	0,003	1 : 10 000	0
0,001	1 : 3000	0	0,001	1 : 30 000	0
0,000 3	1 : 10 000	0	0,000 3	1 : 100 000	0
0,000 1	1 : 30 000	0	0,000 1	1 : 300 000	0

Das Ergebnis dieses Versuches zeigt, daß das Komplement bei gleichbleibenden Mengen von Ambozeptor und Antigen in mäßigen Spannungsverhältnissen der Volumina der Mischungen durchaus nach dem Grade seiner Verdünnung und nicht nach seiner absoluten Menge wirkt.

In beiden Reihen erstreckt sich die komplette Hämolyse bis zu der Komplementverdünnung 1 : 300, während der absolute Komplementgehalt, bei dem die Blutkörperchen gelöst wurden, in der ersten Reihe 0,01 ccm, in der zweiten das Zehnfache dieser Menge beträgt.

Mitunter trat aber, besonders bei größeren Spannungen der Volumina, in denen wir die Reaktion sich vollziehen ließen, eine Änderung der Wirkungsweise des Komplements ein, wie aus dem im folgenden dargestellten Versuche zu ersehen ist.

In diesem Versuche betrug das Gesamtvolumen der ersten Reihe 0,4 ccm, das der zweiten Reihe 4, der dritten 40 ccm; die Spannung der Flüssigkeitsmengen verhielt sich also wie 1 : 10 : 100. Die Antikörpermenge war in allen Proben die gleiche, nämlich 0,001 ccm eines Kaninchenantihammelblutserums vom Titer 0,00025, also etwa das Vierfache des zur Sensibilisierung der Blutkörperchen erforderlichen Quantums.

Als Antigen diente überall 0,1 ccm einer 50%igen Aufschwemmung von dreimal gewaschenen Hammelblutkörperchen. Als Komplement wurde ein von acht Meerschweinchen gewonnenes frisches Mischserum benutzt. Der Versuch wurde in der Weise angestellt, daß zunächst das Komplement mit der erforderlichen Kochsalzmenge versetzt wurde, alsdann wurde der Ambozeptor und zuletzt das Blutsediment hinzugefügt. Die Mischungen blieben zunächst zwei Stunden im Brutschrank bei 37° und wurden auch nach 20 und 40 Stunden nochmals kontrolliert. Das Ergebnis des Versuches zeigt die Tabelle.

Tabelle 17. Versuch vom 16. 9. 1911. Wirkung des hämolytischen Komplements auf gleich stark sensibilisierte Blutkörperchen in wechselnden Verdünnungen.

I. Reihe. Gesamtvolumen = 0,4 ccm					II. Reihe. Gesamtvolumen = 4,0 ccm					III. Reihe. Gesamtvolumen = 40,0 ccm				
Komplementmenge ccm	Komplementverdünnung	Hämolyse nach 2 Std.	20 Std.	44 Std.	Komplementmenge ccm	Komplementverdünnung	Hämolyse nach 2 Std.	20 Std.	44 Std.	Komplementmenge ccm	Komplementverdünnung	Hämolyse nach 2 Std.	20 Std.	44 Std.
0,2	1 : 2	komplett	komplett	komplett	2,0	1 : 2	komplett	komplett	komplett					
0,1	1 : 4	„	„	„	1,0	1 : 4	„	„	„					
0,04	1 : 10	„	„	„	0,4	1 : 10	„	„	„					
0,02	1 : 20	stark	fast komplett	fast komplett	0,2	1 : 20	fast komplett	„	„	2,0	1 : 20	komplett	komplett	komplett
0,01	1 : 40	„	stark	„	0,1	1 : 40	„	fast komplett	fast komplett	1,0	1 : 40	„	„	„
0,004	1 : 100	Spur	gering	gering	0,04	1 : 100	gering	stark	stark	0,4	1 : 100	„	„	„
0,002	1 : 200	„	„	„	0,02	1 : 200	Spur	gering	mäßig	0,2	1 : 200	„	„	„
0,001	1 : 400	0	Spur	Spur	0,01	1 : 400	0	Spur	gering	0,1	1 : 400	fast komplett	fast komplett	fast komplett
0,000 4	1 : 1 000	0	0	0	0,004	1 : 1 000	0	0	0	0,04	1 : 1 000	0	fast 0	fast 0
0,000 2	1 : 2 000	0	0	0	0,002	1 : 2 000	0	0	0	0,02	1 : 2 000	0	0	0
0,000 1	1 : 4 000	0	0	0	0,001	1 : 4 000	0	0	0	0,01	1 : 4 000	0	0	0
—	—	0	0	0	0,000 4	1 : 10 000	0	0	0	0,004	1 : 10 000	0	0	0
Kontrollen ohne Ambozeptor: (in 2 ccm Flüssigkeit)					0,000 2	1 : 20 000	0	0	0	0,002	1 : 20 000	0	0	0
					0,000 1	1 : 40 000	0	0	0	0,001	1 : 40 000	0	0	0
2,0	1 : 1	stark	fast komplett	fast komplett	—	—	0	0	0	0,000 4	1 : 100 000	0	0	0
0,2	1 : 10	0	0	Spur						0,000 2	1 : 200 000	0	0	0
										—	—	0	0	0

Während also die komplette Hämolyse in der ersten und der zweiten Reihe schließlich bis zu derselben Komplementverdünnung, bis 1 : 40 herab eintrat, erfolgte sie in der dritten Reihe bis zur Verdünnung 1 : 400, mithin der absoluten Komplementmenge nach bis zu demselben Werte, der in der zweiten Reihe Hämolyse bedingt

hatte. Dagegen stimmen in diesem Versuche die oberen Grenzen, bei denen die Hämolyse gänzlich ausblieb, annähernd nach der Komplementverdünnung überein, indem sie in den beiden ersten Reihen bei 1 : 400, in der dritten bei der Verdünnung 1 : 1000 lagen.

Wodurch diese Unterschiede der Komplementwirkung bedingt sind, muß dahingestellt bleiben. Vielleicht spielt dabei neben andern Einflüssen der im Komplementserum enthaltene Normalambozeptor eine Rolle, da 2,0 ccm des Meerschweinchenserums die als Antigen benutzte Blutmenge fast komplett zu lösen imstande waren und auch noch 0,2 ccm eine gewisse hämolytische Wirkung entfalteten.

Die aus den bisher mitgeteilten Versuchen über die Wirkungsweise des Komplements gezogenen Schlüsse gelten nur unter der Voraussetzung, daß der Ambozeptor in seiner Wirkung durch die Verdünnung in größeren Flüssigkeitsmengen nicht beeinflußt wird. Der folgende Versuch zeigt nun, daß die Verdünnung des Ambozeptors in der Tat keine Rolle spielt, da sich ein im wesentlichen gleiches Resultat auch dann ergibt, wenn Blutkörperchen, durch vorherige Bindung mit dem Antikörper gleichmäßig sensibilisiert, der Einwirkung der verschiedenen Komplementverdünnungen in variierten Flüssigkeitsmengen ausgesetzt werden.

Zum Versuche wurden 5 ccm einer 50%igen Aufschwemmung gewaschener Hammelblutkörperchen mit 0,0625 ccm des Hammelblut-Kaninchenimmunserums vom Titer 0,00025 versetzt, so daß also auf 1 ccm einer 5%igen Blutkörperchenemulsion das Fünffache der einfach lösenden Dosis kommt. Nach $^1/_2$ stündigem Verweilen bei Zimmertemperatur wurden die agglutinierten Blutkörperchen abzentrifugiert, zweimal gewaschen, alsdann in 50 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt, so daß nun 1 ccm die Antigeneinheit enthielt. Inzwischen waren fallende Mengen frischen Meerschweinchenkomplements in drei Versuchsreihen derart hergerichtet, daß die erste Reihe nur die geringen, im Maximum 0,1 ccm betragenden Mengen der Komplementverdünnungen enthielt, während in der zweiten die gleichen Komplementverdünnungen in 9 ccm, in der dritten in 39 ccm hergestellt wurden. Nach Zusatz von je 1 ccm der Blutemulsion verhielten sich alsdann die Volumina der drei Reihen, abgesehen von den geringen Abweichungen innerhalb der ersten Reihe wie 1 : 10 : 40. Die Mischungen wurden zwei Stunden bei 37° belassen; das Ergebnis zeigt die folgende Tabelle.

Tabelle 18. Wirkungsweise des Komplements in wechselnden Verdünnungen auf gleichmäßig durch Ambozeptorbindung sensibilisierte Blutkörperchen.

Erste Reihe Gesamtvolumen etwa 1 ccm			Zweite Reihe Gesamtvolumen 10 ccm			Dritte Reihe Gesamtvolumen 40 ccm		
Komplementmenge ccm	Komplementverdünnung	Hämolyse	Komplementmenge ccm	Komplementverdünnung	Hämolyse	Komplementmenge ccm	Komplementverdünnung	Hämolyse
0,1	1 : 10	komplett	1,0	1 : 10	komplett	4,0	1 : 10	komplett
0,03	c. 1 : 30	fast komplett	0,3	c. 1 : 30	„	1,2	c. 1 : 30	„
0,02	1 : 50	nicht komplett	0,2	1 : 50	„	0,8	1 : 50	„
0,01	1 : 100	stark	0,1	1 : 100	„	0,4	1 : 100	„
0,003	c. 1 : 300	„	0,03	c. 1 : 300	nicht komplett	0,12	c. 1 : 300	fast komplett
0,002	1 : 500	mäßig	0,02	1 : 500	stark	0,08	1 : 500	stark
0,001	1 : 1000	fast 0	0,01	1 : 1000	fast 0	0,04	1 : 1000	fast 0

Wie der Versuch zeigt, verhielt sich die Hämolyse in der zweiten und dritten Reihe fast ganz gleich; die Reaktion war in diesen beiden Reihen bis zur gleichen Verdünnung hin komplett und blieb auch beim selben Verdünnungsgrade aus. In der ersten Reihe dagegen liegt die Grenze der kompletten Lyse verglichen mit den beiden anderen Reihen bei einer zehnfach stärkeren Konzentration; dagegen hört die Hämolyse auch in dieser Reihe bei der Verdünnung 1 : 1000 gänzlich auf wie in den anderen beiden Reihen. Worauf diese häufiger von uns beobachtete Hemmung der Hämolyse in kleineren Flüssigkeitsmengen beruht, ob etwa die schnellere Verklumpung und Sedimentierung der Blutkörperchen dabei eine Rolle spielt oder ob unterhalb einer gewissen absoluten Komplementmenge auch bei starker Konzentration die Hämolyse unvollkommen bleibt, mag dahingestellt bleiben.

Während eine Anzahl unserer Versuche, besonders solche mit kleinen Spannungen der Gesamtvolumina, ganz mit Schellers Ergebnissen übereinstimmten, in dessen Versuchen es sich ja übrigens auch meist um ziemlich geringe Volumunterschiede handelt, haben andere Experimente, vor allem dann, wenn Differenzen im Verhältnis von 1 : 50 oder 1 : 100 vorkamen, mehr oder weniger stark abweichende Resultate gehabt. Da aber unsere Versuchsanordnung in einem von Scheller als wichtig angesehenen Punkte von seiner Technik abweicht, nämlich darin, daß wir die Hämolyse immer im Brutschrank, nicht im Wasserbade vor sich gehen ließen, so sind unsere Ergebnisse jedenfalls nicht gegen Scheller zu verwerten.

Wir glauben im Gegenteil aus der Gesamtheit der Ergebnisse den Schluß ziehen zu können, daß die von Scheller beobachtete Gesetzmäßigkeit der Komplementwirkung gemäß der Verdünnung in dem Reaktionsmedium in der Tat besteht, wenigstens innerhalb nicht allzu großer Unterschiede der Flüssigkeitsvolumina.

Wir haben diese Untersuchungen nicht noch weiter fortgesetzt, da inzwischen von verschiedenen Seiten über analoge Versuche berichtet worden ist. Es sei, abgesehen von den schon erwähnten Veröffentlichungen von Kiß[1]) und Scheller[2]) auf die Arbeiten von Liefmann in Gemeinschaft mit Cohn und Andreew[3]) verwiesen. Aus diesen Beobachtungen sind überwiegend, wenn auch nicht ausschließlich dieselben Ergebnisse hervorgegangen wie aus den Versuchen Schellers. In der Arbeit von Fränkel[4]) sind allerdings Versuche mitgeteilt worden, von denen nur eine Minderzahl Resultate hatten, die mit Schellers Ergebnissen übereinstimmen. Die Ursachen dieser wechselnden Befunde sind wohl noch nicht geklärt, zum Teil dürften Abweichungen der Versuchstechnik daran Schuld sein; wie schon erwähnt könnte auch der Gehalt des Komplements an Normalambozeptoren dabei zur Geltung kommen.

Jedenfalls tritt bei der Wirkung des Komplements mit Sicherheit ein sehr bedeutender Einfluß der Verdünnung zutage; in keinem unserer Versuche trat die komplette Hämolyse in allen Reihen bei derselben Komplementdosis ein, die in der Reihe mit dem geringsten Flüssigkeitsvolumen, beim Fehlen von Hemmungserscheinungen, dazu genügt hatte, sondern entsprechend der stärkeren Verdünnung, erst bei größeren Komplementmengen.

---

[1]) Zeitschr. f. Immun. Forsch. III, 558. — [2]) Zentralbl. f. Bakt. 56, H. 2; 61, S. 120; Mikrobiologen-Vers. Dresden 1911. — [3]) Zeitschr. f. Immunit. Forsch. Bd. 7, 8 u. 11. — [4]) Ebenda Bd. 10.

Untersuchungen über die Wirkungsweise des Ambozeptors.

Ganz anders liegen die Verhältnisse bei der Wirkungsweise des hämolytischen Ambozeptors. Das geht schon aus den soeben mitgeteilten Komplementversuchen hervor, in denen ja die sensibilisierende Wirkung der gleichen Ambozeptordosis im einfachen, 10fachen und 100fachen Flüssigkeitsvolumen keinen Unterschied erkennen ließ.

Wir haben die Wirkungsweise des Ambozeptors in weiteren Versuchen untersucht, wobei die gleiche Menge von Blutkörperchen (1,0 ccm 5 % Hammelblut) in verschiedenen Mengen von Kochsalzlösung aufgeschwemmt und mit fallenden Ambozeptordosen versetzt wurde; dazu wurde soviel Komplement gegeben, daß es in allen Reihen in derselben Konzentration enthalten war. Die Versuche ergaben, wie die folgenden beiden Tabellen zeigen, daß die Hämolyse überall bei der gleichen absoluten Ambozeptormenge, ohne Rücksicht auf die Verdünnung, erfolgte.

Tabelle 19. Versuch vom 21. 1. 1911. Wirkung des hämolytischen Ambozeptors in variierten Flüssigkeitsmengen bei sonst gleichen Verhältnissen.

Gesamtvolumen 3 ccm			Gesamtvolumen 10 ccm			Gesamtvolumen 10 ccm		
Ambozeptormenge ccm	Ambozeptorverdünnung	Resultat	Ambozeptormenge ccm	Ambozeptorverdünnung	Resultat	Ambozeptormenge ccm	Ambozeptorverdünnung	Resultat
0,1	1 : 30	komplette Hämolyse	0,1	1 : 100	komplette Hämolyse	0,33	c. 1 : 30	komplette Hämolyse
0,05	1 : 60	„	0,05	1 : 200	„	0,17	„ 1 : 60	„
0,01	1 : 300	„	0,01	1 : 1000	„	0,033	„ 1 : 300	„
0,005	1 : 600	„	0,005	1 : 2000	„	0,017	„ 1 : 600	„
0,001	1 : 3000	„	0,001	1 : 10 000	„	0,003 3	„ 1 : 3000	„
0,000 75	1 : 4000	„	0,000 75	1 : 15 000	„	0,002 5	„ 1 : 4000	„
0,000 5	1 : 6000	fast komplett	0,000 5	1 : 20 000	fast komplett	0,001 7	„ 1 : 6000	„
0,000 25	1 : 12 000	±	0,000 25	1 : 40 000	±	0,000 8	„ 1 : 12 000	„
0,000 1	1 : 30 000	±	0,000 1	1 : 100 000	±	0,000 33	„ 1 : 30 000	±
0,000 05	1 : 60 000	0	0,000 05	1 : 200 000	0	0,000 17	„ 1 : 60 000	±
0,000 01	1 : 300 000	0	0,000 01	1 : 1 000 000	0	0,000 033	„ 1 : 300 000	0

Tabelle 19a. Versuch vom 25. 11. 1911. Prüfung der Ambozeptorwirkung bei ungleicher Konzentration und gleicher absoluter Menge.

Ambozeptormenge ccm	Gesamtvolumen 2 ccm				Gesamtvolumen 40 ccm			
	Ambozeptorverdünnung	Komplementmenge ccm	Blutkörperchen	Resultat der Hämolyse nach 2 Stunden	Ambozeptorverdünnung	Komplementmenge ccm	Blutkörperchen	Resultat der Hämolyse nach 2 Stunden
0,001	1 : 2000	0,2	1 ccm 5 %iges Hammelblut	Hämolyse komplett	1 : 40 000	4,0	1 ccm 5 %iges Hammelblut	Hämolyse komplett
0,000 75	c. 1 : 2 600	0,2		„	c. 1 : 53 000	4,0		„
0,000 5	1 : 4000	0,2		„	1 : 80 000	4,0		„
0,000 3	c. 1 : 6000	0,2	„	„	c. 1 : 133 000	4,0	„	„
0,000 25	1 : 8000	0,2	„	„	1 : 160 000	4,0	„	„
0,000 2	1 : 10 000	0,2	„	„	1 : 200 000	4,0	„	„
0,000 1	1 : 20 000	0,2	„	mäßig	1 : 400 000	4,0	„	mäßig
0,000 075	c. 1 : 26 000	0,2	„	gering	c. 1 : 530 000	4,0	„	gering
—	—	0,2	„	Keine Hämolyse	—	4,0	„	Keine Hämolyse

Danach verhält sich der Ambozeptor also vollkommen anders wie das Komplement. Auf seine Wirkung hat die Verdünnung keinen Einfluß. Das gilt auch bei der vorherigen Sensibilisierung der Blutkörperchen mit variierten Ambozeptormengen in wechselnden Verdünnungen. Wir konnten so auch hundertfach größere Ambozeptorverdünnungen bei gleicher absoluter Menge in ihrem spezifischen Einfluß auf Blutkörperchen untersuchen und haben nach dieser Methode in vielen Proben ebenfalls stets analoge Resultate gehabt wie in den soeben beschriebenen Versuchen. Ein Beispiel für diese Bindungsversuche sei im folgenden gegeben.

Versuch vom 19. 3. 1911.

Zum Versuche wurden 0,2 ccm einer 10 % gewaschenen Hammelblutemulsion in drei Versuchsreihen mit fallenden Ambozeptordosen in zwischen 0,4, 4,0 und 40,0 ccm schwankenden Flüssigkeitsmengen erst 1½ Stunde bei 37°, dann 18 Stunden im Eisschrank belassen. Darauf wurden die Flüssigkeitsmengen der beiden ersten Reihen mit Kochsalz auf 40,0 ccm aufgefüllt, die Blutkörperchen auszentrifugiert und noch einmal in gleichen Kochsalzmengen gewaschen. Der Bodensatz wurde in Kochsalzlösung aufgeschwemmt und nach Abzug von 2 für einen Phagozytoseversuch gebrauchten Tropfen mit 0,05 Komplement im Brutschrank eine Stunde lang inkubiert. Die Ambozeptormengen und das Resultat des Experimentes zeigt die Tabelle.

Tabelle 20. Wirkung des hämolytischen Ambozeptors in variierten Flüssigkeitsmengen; Bindungsversuch.

Gesamtvolumen bei der Bindung 0,4 ccm			Gesamtvolumen bei der Bindung 4,0 ccm			Gesamtvolumen bei der Bindung 40,0 ccm		
Ambozeptormenge ccm	Ambozeptorverdünnung	Resultat der Hämolyse	Ambozeptormenge ccm	Ambozeptorverdünnung	Resultat der Hämolyse	Ambozeptormenge ccm	Ampozeptorverdünnung	Resultat der Hämolyse
0,000 2	1 : 2 000	komplette Hämolyse	0,002	1 : 2 000	komplette Hämolyse	0,02	1 : 2 000	komplette Hämolyse
0,000 02	1 : 20 000	Spur Hämolyse	0,000 2	1 : 20 000	„	0,002	1 : 20 000	„
0,000 002	1 : 200 000	0	0,000 02	1 : 200 000	Spur Hämolyse	0,000 2	1 : 200 000	„
0,000 000 2	1 : 2 000 000	0	0,000 002	1 : 2 000 000	0	0,000 02	1 : 2 000 000	Spur Hämolyse
0,000 000 02	1 : 20 000 000	0	0,000 000 2	1 : 20 000 000	0	0,000 002	1 : 20 000 000	0

Dieser Versuch scheint uns die Richtigkeit der Annahme zu beweisen, daß es bei der Ambozeptorwirkung innerhalb nicht allzu großer Grenzen auf die Verdünnung nicht ankommt; die Verdünnungen, in denen eben noch Sensibilisierung eintrat, schwankten zwischen 1:2000 und 1:200000, die absolute Ambozeptormenge lag aber stets bei 0,0002. Das gilt aber vielleicht nur für hochwertige Immunsera mit hochaviden Antikörpern.

Versuche mit dem Agglutinin.

Wir haben auch den Agglutinationsvorgang in unsere Untersuchungen hineingezogen. Hier ist ja die Titerbestimmung nach der Verdünnung des Immunserums allgemein üblich. Und doch haben wir uns in den — allerdings wenigen und nur nach einer einzigen Methode angestellten Versuchen — überzeugen können, daß bei dieser Versuchsanordnung ein direktes von der Flüssigkeitsmenge unabhängiges Verhältnis zwischen Antikörper und Antigen besteht.

Wir haben nicht den Agglutinationsvorgang selbst als Maßstab für die Antigen-Antikörperreaktion benutzt, weil bei ungleichen Flüssigkeitsmengen durch die verschiedenen räumlichen Beziehungen der Antigenelemente zu ungleiche Bedingungen für die Agglutination geschaffen werden; insbesondere läßt sich die Bakterienagglutination nach der gewöhnlichen Methode bei zu weitgehender Verdünnung der Aufschwemmung nicht gut beobachten. Wir bedienten uns vielmehr der Sedimentation, die den in einer großen Flüssigkeitsmenge suspendierten Elementen eine zwar langsamere, aber ebenso typische Ablagerung am Boden des Glases gestattet wie in kleinem Volumen. Ferner benutzten wir nicht Bakterien, sondern Blutkörperchen wegen der besseren Absetzung und des Fortfalles der störenden Vermehrung. Die Versuche wurden in der Weise angestellt, daß zu gleichen ganz kleinen Mengen der Immunserumverdünnungen — benutzt wurde ein Kaninchenantihammelblutserum vom hämolytischen Titer 0,00025 — in mehreren Versuchsreihen je 1 ccm gewaschenen Hammelblutes zugesetzt wurde, nachdem in einem Teil der Röhrchen 10 bezw. 20 ccm Kochsalzlösung gegeben waren. Die Proben blieben 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen, sie zeigten darauf sehr deutlich entweder, bei positivem Ausfall, eine krümlige, die ganze Konkavität des Röhrchenbodens gleichmäßig bedeckende Ablagerung von Blutkörperchen, oder, wenn negativ, eine Ansammlung derselben auf einem ziemlich kleinen rundlichen Bezirk in der Kuppe des Röhrchens. Nach Feststellung der meist ganz scharfen Grenze der Reaktion wurden die kleinen Volumina mit Kochsalzlösung bis zur Gleichheit mit den größten Flüssigkeitsmengen aufgefüllt (bezw. in einem andern Versuch die großen Volumina entsprechend abgegossen) und nun wurde der Grad der Verklumpung nach Schütteln in beiden Reihen verglichen; er war fast ganz gleich und seine Grenze fiel mit der der Sedimentation zusammen.

Im folgenden sei ein solcher Versuch mitgeteilt (s. Tabelle 20a, S. 60).

Der Versuch zeigt, daß die Sedimentationsreaktion innerhalb nicht zu großer Grenzen der Volumenspannungen ziemlich genau nach der absoluten Menge des Antiserums verläuft.

Untersuchungen über die Wirkungsweise des Tropins.

Es lag nahe, zu untersuchen, wie die entsprechenden Verhältnisse bei einer Gruppe von Antikörpern liegen, in deren Wirkungsweise sonst einige Unterschiede von den übrigen Antikörpern zutage trete: bei den thermostabilen phagozytären Stoffen, den Tropinen. Wir haben Phagozytoseversuche nach dieser Richtung mit Blutkörperchen und mit Bakterien (Pneumokokken) angestellt und uns dabei sowohl der direkten Phagozytose, d. h. der Versuchsanordnung, in welcher Antikörper, Antigen

Tabelle 20a. Sedimentation von Hammelblutkörperchen unter Immunserumeinwirkung. Versuch vom 24. 1. 1911.

Immunserum ccm	Sedimentation in 1 ccm Gesamtvolumen	Sedimentation in 10 ccm Gesamtvolumen	Sedimentation in 20 ccm Gesamtvolumen
0,1	+	+	+
0,03	+	+	+
0,01	+	+	+
0,003	+	+	+
0,001	+	+	+ (doch etwas schwächer)
0,000 75	0	0	0
0,000 3	0	0	0
0,000 1	0	0	0

und Leukozyten miteinander gemischt werden, wie der Phagozytose vorher sensibilisierter Elemente bedient.

Die Ergebnisse dieser Versuche waren bei der ersten Methode, dem direkten Phagozytoseversuch, ziemlich verschieden. Wir nehmen an, daß die Bedingungen für das Eintreten der Reaktion in großen Flüssigkeitsmengen bei der Phagozytose viel ungünstiger liegen wie bei der Hämolyse, da es sich hier um zwei geformte Elemente handelt, deren Berührung bei starker Verteilung in reichlichem Suspensionsmedium an sich sehr erschwert wird. Dazu kommt, daß durch die verlangsamte Sedimentierung der Elemente bei großem Volumen auch ihr Zusammentreffen am Boden des Reagenzglases, durch welches die Phagozytose begünstigt wird, in viel spärlicherem Grade stattfindet als beim Versuch mit geringen Flüssigkeitsmengen.

Wir haben nun versucht, der Phagozytose dadurch günstigere Bedingungen zu schaffen, daß wir die Mischungen im Brutschrank einer dauernden Bewegung aussetzten. Obwohl dadurch eine deutliche Verstärkung der Reaktion bewirkt wurde, führte uns diese Methode doch nicht weiter, weil wir aus technischen Gründen größere Flüssigkeitsmengen dieser Behandlung nicht unterwerfen konnten. Wir versuchten ferner, den Ausfall der Phagozytose durch den Zusatz von aktivem Normalserum zu verstärken; es gelang dies auch in gewissem Grade, indem diejenigen Tropinmengen, die überhaupt Phagozytose verursachten, bei Zusatz von Normalserum eine stärkere Aufnahme des Antigens durch die Leukozyten erzeugten. Ob diese Verstärkung der Reaktion durch eine komplexe Wirkung bedingt wird, ob sie auf einer Paralysierung der schädigenden Einflüsse des Immunserums auf die Leukozyten beruht, oder darauf, daß eine besondere Aktivität der Leukozyten im homologen Serum eintritt, lassen wir dahingestellt. Eine absolute Verstärkung der Phagozytose durch aktives Serum, der Art, daß auch Serummengen, die sonst keine Reaktion mehr bedingten, nach Normalserumzusatz Phagozytose eintreten ließen, haben wir dabei nicht beobachtet. Bei größeren Flüssigkeitsvolumina, wie sie für die Untersuchung der quantitativen Verhältnisse benutzt werden müssen, hatte diese Methode aber auch keine deutlichen Vorzüge.

Im folgenden seien zunächst einige von den zahlreichen Phagozytoseversuchen wiedergegeben, in denen die Reaktion fast ganz der Verdünnung des Tropinserums zu folgen schien. Das nächste Protokoll zeigt einen Versuch mit einem Pneumokokkenstamm und hochwertigem Immunserum in fallenden Mengen; in der einen Reihe war die Gesamtmenge = 0,3 ccm, in der anderen Reihe = 3,0 ccm; das Resultat zeigt, daß das spezifische Serum in diesem Falle nach dem Grade der Verdünnung wirkte und daß die absolute Menge des Antiserums keinen Einfluß auf den Ausfall zu haben schien, da in der ersten Reihe 0,003 ccm des Antiserums noch Phagozytose bewirkten, während diese Dosis in der zweiten Reihe schon wirkungslos war.

Tabelle 21. Versuch vom 3. 2. 1911. Pneumokokkenphagozytose in vitro bei variierter Flüssigkeitsmenge und sonst gleichen Bedingungen.

Gesamtvolumen der Komponenten = 0,3 ccm			Gesamtvolumen der Kompenenten = 3,0 ccm		
Immunserum ccm	Verdünnung	Resultat	Immunserum ccm	Verdünnung	Resultat
0,1	1 : 3	+	0,1	1 : 30	+
0,03	1 : 10	+++	0,03	1 : 100	+
0,01	1 : 30	++	0,01	1 : 300	fast 0
0,003	1 : 100	+	0,003	1 : 1000	0
0,001	1 : 300	fast 0	0,001	1 : 3000	0
Kontrolle	—	0	Kontrolle	—	0

Ein ganz gleiches Ergebnis hatte der folgende Versuch mit Hammelblutkörperchen und einem hochwertigen Antihammelblutkaninchenserum. Zum Versuche wurden in zwei Reihen je 2 Tropfen einer 5% gewaschenen Blutaufschwemmung und einer Leukozytenemulsion in gleicher Weise mit abgestuften Immunserummengen zwei Stunden im Brutschrank belassen; in der ersten Versuchsreihe betrug die gesamte Flüssigkeitsmenge 0,3 ccm, in der zweiten 3,0 ccm. Das Ergebnis zeigt das folgende Protokoll.

Tabelle 22. Versuch vom 16. 5. 1911. Hammelblutkörperchenphagozytose in vitro bei variierter Flüssigkeitsmenge und sonst gleichen Bedingungen.

Gesamtvolumen 0,3 ccm			Gesamtvolumen 3,0 ccm		
Antiserummenge ccm	Antiserumverdünnung	Resultat der Phagozytose	Antiserummenge ccm	Antiserumverdünnung	Resultat der Phagozytose
0,003	1 : 100	sehr stark	0,03	1 : 100	recht stark
0,001	1 : 300	stark	0,01	1 : 300	stark
0,000 3	1 : 1 000	„	0,003	1 : 1 000	ziemlich stark
0,000 1	1 : 3 000	„	0,001	1 : 3 000	„
0,000 03	1 : 10 000	„	0,000 3	1 : 10 000	mäßig
0,000 01	1 : 30 000	„	0,000 1	1 : 30 000	„
0,000 003	1 : 100 000	mäßig	0,000 03	1 : 100 000	„
0,000 001	1 : 300 000	fast 0	0,000 01	1 : 300 000	fast 0
0,000 000 3	1 : 1 000 000	„	0,000 003	1 : 1 000 000	„
Kochsalzkontrolle		„	Kochsalzkontrolle		„

Zur Deutung dieses Versuches kann wohl durchaus das gleiche gesagt werden wie zum vorhergehenden. Auch hier liegt die Grenze der Serumwirkung bei derselben Serumkonzentration, nicht bei derselben absoluten Antikörpermenge.

Der nächste Versuch zeigt eine Phagozytose von Hühnerblutkörperchen durch Meerschweinchenleukozyten unter den Einfluß eines hochwertigen spezifischen Immunserums. Zur Feststellung des Titers des Serums wurden zwei Tropfen einer gut gewaschenen Leukozytenaufschwemmung mit einer 1%igen Emulsion von Hühnerblutkörperchen und fallenden Mengen des Antiserums gemischt, so daß die Gesamtmenge der Flüssigkeit 0,2 ccm betrug. Wie aus dem folgenden Protokoll ersichtlich ist, lag die Titerdosis bei 0,0001 ccm, also bei einer Serumverdünnung von 1 : 2000.

Tabelle 23. Versuch vom 31. 1. 1911. Titerbestimmung der phagozytären Wirkung eines Antihühnerblut-Kaninchenserums.

1%ige Hühnerblutkörperchenemulsion; Bebrütung 2 Stunden bei 37°.

	Immunserummenge ccm	Resultat der Phagozytose
1	0,1	sehr stark
2	0,01	»
3	0,001	»
4	0,000 3	stark
5	0,000 1	mäßig
6	0,000 03	fast 0
7	0,000 01	»
8	0,000 003	»
9	Kochsalzkontrolle	»

Nun wurde diese, der Reaktionsgrenze entsprechende Serumverdünnung in drei Versuchsreihen mit im Verhältnis von 1 : 10 : 50 variierten Gesamtvolumen und sonst gleichbleibenden Komponenten auf ihren phagozytären Effekt in einen zweiten, gleichzeitig mit denselben Leukozyten angestellten Versuch geprüft.

Das Ergebnis war folgendes:

Tabelle 24. Versuch vom 31. 1. 1911. Hühnerblutkörperchenphagozytose bei gleicher Serumverdünnung in variierten Flüssigkeitsmengen.

	Menge des Serums ccm	Volumen ccm	Serum-verdünnung	Resultat der Phagozytose
1	0,000 1	0,2	1 : 2 000	deutlich, mäßig, durchaus gleichartig
2	0,001	2,0	1 : 2 000	
3	0,005	10,0	1 : 2 000	

Aus der Tabelle geht hervor, daß bei absolut größeren Antikörpermengen eine Verstärkung der Phagozytose nicht eintrat. Wäre die Tropinwirkung nach der absoluten Serummenge erfolgt, dann hätten Nr. 2 und 3 in Tabelle 24 sehr starke Phago-

zytose, entsprechend Nr. 2 und 3 des vorhergehenden Versuchs zeigen müssen, was keineswegs der Fall war. Vielmehr war die Phagozytose in allen 3 Proben des Versuches etwa gleich stark und entsprach durchaus Nr. 5 des Protokolls Nr. 23; und in allen diesen Proben war die gleiche Antikörperkonzentration bei sehr verschiedenem Flüssigkeitsvolumen vorhanden.

Nun aber fielen durchaus nicht alle Phagozytoseexperimente entsprechend dem Verdünnungsgrad des Antiserums aus; in einigen Versuchen erfolgte die Reaktion weder nach der absoluten Menge des Ambozeptors noch nach seiner Konzentration; als Beispiel dafür diene der folgende Versuch. In diesem wurden von einer 5 %igen Hammelblutkörperchenaufschwemmung 2 Tropfen mit je 2 Tropfen einer Leukozytenaufschwemmung gemischt; dann wurde soviel Kochsalzlösung hinzugefügt, daß in der ersten Versuchsreihe ein Gesamtvolumen von 0,3, in der zweiten ein solcher von 3,0 ccm resultierte; schließlich wurden zu allen Proben in gleicher Weise fallende Immunserummengen zugesetzt. Das Ergebnis zeigt die Tabelle.

Tabelle 25. Versuch vom 23. 1. 1911. Hammelblutkörperchenphagozytose in variierten Flüssigkeitsvolumina bei gleicher Antiserumabstufung.

Reihe I Gesamtvolumen der Komponenten = 0,3 ccm			Reihe II Gesamtvolumen der Komponenten = 3,0 ccm		
Immunserum ccm	Verdünnung	Resultat	Immunserum ccm	Verdünnung	Resultat
0,003	1 : 100	++	0,003	1 : 1 000	+
0,001	1 : 300	++	0,001	1 : 3 000	+
0,000 3	1 : 1 000	++	0,000 3	1 : 10 000	+
0,000 1	1 : 3 000	+	0,000 1	1 : 30 000	±
0,000 03	1 : 10 000	+	0,000 03	1 : 100 000	±
0,000 01	1 : 30 000	+	0,000 01	1 : 300 000	0
0,000 003	1 : 100 000	±	0,000 003	1 : 1 000 000	0
0,000 001	1 : 300 000	±	0,000 001	1 : 3 000 000	0
0,000 000 3	1 : 1 000 000	0	0,000 000 3	1 : 10 000 000	0
Kontrolle	—	0	Kontrolle	—	0

Hier blieb also die Phagozytose in der zweiten Reihe noch etwas hinter der in der ersten Reihe wirksamen Verdünnung zurück; immerhin aber entsprach das Ergebnis doch mehr dem Konzentrationsgrade des Antiserums als dem absoluten Tropingehalt.

In einigen Versuchen schien das Ergebnis der Phagozytose mehr der absoluten Serummenge zu folgen, obwohl sich die Anordnung der Experimente nicht von der bei anderen Versuchen eingehaltenen unterschied. Ein Beispiel für ein derartig ausgefallenes Experiment sei im folgenden Protokoll gegeben.

Auch in diesem Versuch schwankten die Flüssigkeitsvolumina bei gleichartig fallenden Antikörpermengen und sonst gleichen Quantitäten von Antigen und Leukozyten zwischen 0,3 und 3,0 ccm. Das Resultat war folgendes:

Tabelle 26. Pneumokokkenphagozytose in vitro bei variierter Flüssigkeitsmenge unter sonst gleichen Bedingungen.

Volumen 0,3 ccm			Volumen 3,0 ccm		
Serummenge ccm	Serumverdünnung	Resultat der Phagozytose	Serummenge ccm	Serumverdünnung	Resultat der Phagozytose
0,1	1 : 3	stark	0,1	1 : 30	stark
0,03	1 : 10	sehr stark	0,03	1 : 100	„
0,01	1 : 30	stark	0,01	1 : 300	ziemlich stark
0,003	1 : 100	fast 0	0,003	1 : 1 000	0
0,001	1 : 300	0	0,001	1 : 3 000	0
Kochsalzkontrolle	—	0	Kochsalzkontrolle	—	0

Der Versuch zeigt, daß die Phagozytose in der größeren Flüssigkeitsmenge im ganzen in etwas geringerem Grade eintritt als im kleineren Volumen, daß aber die Grenze, bei der die Reaktion in beiden Reihen noch eben positiv war, etwa bei der gleichen Serumsmenge, bei 0,01 ccm liegt, während die Verdünnung 1 : 300, die in der zweiten Reihe noch Phagozytose erkennen ließ, in der ersten Reihe keine solche bewirkte.

Wir würden auf die wenigen in diesem Sinne ausgefallenen Versuche keinen Wert legen und sie als durch unserer Kenntnis entgangene Zufälligkeiten oder Fehler der Methode bedingt ansehen, wenn nicht die Phagozytoseversuche mit vorher sensibilisiertem Antigen in derselben Weise ausgefallen wären.

Wir haben Bindungsversuche deswegen vorgenommen, weil uns die direkte Methode der Phagozytose für die Untersuchung quantitativer Verhältnisse zu unsicher zu sein schien. Denn obwohl die Reaktion auch in Flüssigkeitsmengen bis zu 10 ccm noch in deutlich wahrnehmbarem Grade eintrat, war die Möglichkeit doch nicht von der Hand zu weisen, daß der Ausfall der Versuche zum Teil durch die rein mechanisch-räumliche Behinderung des Zusammentreffens der beiden Komponenten in den größeren Flüssigkeitsmengen bedingt war.

Daher wurden in einer Reihe von Versuchen Blutkörperchen nach der Sensibilisierung in Kochsalzlösung-Antiserumgemischen der Phagozytose durch Meerschweinleukozyten in der von uns bei der gewöhnlichen Technik des Phagozytoseversuches angewandten Flüssigkeitsmenge von etwa 0,3 ccm ausgesetzt; der Erfolg der Sensibilisierung wurde regelmäßig durch einen gleichzeitigen Hämolyseversuch kontrolliert.

Diese Versuche führten nun zu durchaus anderen und zwar ganz regelmäßigen Ergebnissen. Es wurde dabei stets ein vollkommener Parallelismus der Phagozytose mit der absoluten Antikörpermenge und eine völlige Übereinstimmung mit der Hämolysereaktion derselben sensibilisierten Blutkörperchen beobachtet.

Im folgenden sei ein solcher Versuch mitgeteilt, zu dem für jede Probe 0,2 ccm einer 5% Emulsion von gewaschenen Hammelblutkörperchen mit fallenden Ambozeptor-

mengen einmal in 0,4 ccm Gesamtflüssigkeitsmenge, in einer zweiten Reihe mit 4,0 ccm, in einer dritten mit 40,0 ccm eine Stunde bei 37° belassen wurden, worauf alle Proben nach Auffüllung auf das gleiche Volumen von 40,0 ccm auszentrifugiert und noch zweimal gewaschen wurden. Der Bodensatz wurde in 0,15 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt, 2 Tropfen jeder Probe zur Phagozytose, der Rest zur Hämolyse benutzt. Das Resultat der Phagozytose- und Hämolysereaktion zeigt das folgende Protokoll.

Tabelle 27. Versuch vom 1. 3. 1911. Phagozytose und Hämolyse von Hammelblutkörperchen nach der Bindung mit fallenden Ambozeptormengen in variiertem Volumen.

Reihe I. Gesamtvolumen bei der Sensibilisierung = 0,4 ccm				Reihe II. Gesamtvolumen bei der Sensibilisierung = 4,0 ccm				Reihe III. Gesamtvolumen bei der Sensibilisierung = 40,0 ccm			
Immunserum ccm	Verdünnung	Resultat H.	Ph.	Immunserum ccm	Verdünnung	Resultat H.	Ph.	Immunserum ccm	Verdünnung	Resultat H.	Ph.
								0,02	1 : 2 000	komplett	+
				0,002	1 : 2 000	komplett	+	0,002	1 : 20 000	„	+
0,000 2	1 : 2 000	komplett	+	0,000 2	1 : 20 000	„	+	0,000 2	1 : 200 000	„	+
0,000 02	1 : 20 000	Spur	0	0,000 02	1 : 200 000	Spur	0	0,000 02	1 : 2 000 000	Spur	0
0,000 002	1 : 200 000	0	0	0,000 002	1 : 2 000 000	0	0	0,000 002	1 : 20 000 000	0	0
0,000 000 2	1 : 2 000 000	0	0	0,000 000 2	1 : 20 000 000	0	0	0,000 000 2	1 : 200 000 000	0	0
0,000 000 02	1 : 20 000 000	0	0	0,000 000 02	1 : 200 000 000	0	0	0,000 000 02	1 : 2 000 000 000	0	0

Aus diesem Versuche geht hervor, daß bei der Bindung des phagozytären wie des hämolytischen Antikörpers die Verdünnung mit Kochsalzlösung keinen Einfluß hat, sondern daß die Sensibilisierung der Blutkörperchen sowohl zur Lysis wie zur Phagozytose bei der Titerdosis des betreffenden Antiserums eintritt, gleichgültig in welcher Menge von Kochsalzlösung die Komponenten sich befinden.

Das gleiche Resultat erhielten wir auch in Versuchen mit Erythrozyten des Huhns, wovon der im folgenden dargestellte ein Beispiel geben mag.

Zum Versuche wurden 0,2 ccm einer 5%igen Blutkörperchenaufschwemmung des Huhns einmal in 0,4 ccm, in einer zweiten Reihe mit 4,0 ccm Gesamtvolumen 2 Stunden mit fallenden Ambozeptordosen im Brutschrank belassen, dann auszentrifugiert und zweimal gewaschen; der Bodensatz wurde in 1,5 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt, 2 Tropfen wurden zur Phagozytose mit 2 Tropfen Leukozytenemulsion bebrütet, der Rest wurde zur Hämolysereaktion benutzt. Das Ergebnis ist in der folgenden Tabelle 28 (S. 66) wiedergegeben.

Auch hier also erfolgten Phagozytose und Hämolyse bis zu derselben Immunserumdosis, gleichgültig ob der Antikörper in der einfachen oder in der zehnfachen Flüssigkeitsmenge gelöst war.

Es besteht demnach eine starke Differenz in der Wirkungsweise des Tropins im direkten Phagozytose- und im Bindungsversuch in Kochsalzlösung.

Tabelle 28. Phagozytose und Hämolyse von Hühnerblutkörperchen nach der Bindung mit gleichmäßig abgestuften Ambozeptormengen in variiertem Volumen.

Volumen bei der Sensibilisierung = 0,4 ccm				Volumen bei der Sensibilisierung = 4,0 ccm			
Ambozeptormenge ccm	Ambozeptorverdünnung	Resultat der		Ambozeptormenge ccm	Ambozeptorverdünnung	Resultat der	
		Phagozytose	Hämolyse			Phagozytose	Hämolyse
0,02	1 : 20	stark	komplett	0,02	1 : 200	ziemlich stark	komplett
0,002	1 : 200	ziemlich stark	„	0,002	1 : 2 000	„	„
0,000 2	1 : 2 000	mäßig	fast komplett	0,000 2	1 : 20 000	mäßig	fast komplett
0,000 02	1 : 20 000	fast 0	0	0,000 02	1 : 200 000	fast 0	0
Kochsalzkontrolle	—	„	0	Kochsalzkontrolle	—	„	0

Diesen Unterschied konnten wir uns zum Teil wohl durch die angedeuteten, bei der Sensibilisierung vermiedenen mechanischen Störungen des Phagozytoseprozesses erklären. Aber ganz geklärt wird er durch dieses Moment nicht, da einmal die Phagozytose bei starker Serumkonzentration auch in relativ sehr großen Flüssigkeitsmengen, bei 10 bis 15 ccm noch eintrat, anderseits bei hinreichender Antiserumdosis, aber zu geringer Konzentration auch in Flüssigkeitsmengen unterblieb, die nicht so viel über dem im gewöhnlichen Phagozytoseversuch angewandten Volumen standen (z. B. bei 2 ccm). Man müßte also noch an andere störende Einflüsse denken. Beim Vergleich der Hämolyse- und Sensibilisierungsversuche einerseits, der Phagozytoseversuche anderseits scheint uns darin ein wichtiger Unterschied der beiden Methoden gegeben zu sein, daß sich bei den ersteren das Antigen und der Antikörper in Kochsalzlösung allein gegenüber stehen, während im Phagozytoseversuch ein drittes Element, die Leukozyten hinzukommen, die zwar keine spezifische Bindung, aber vielleicht Reaktionen physikalisch-chemischer Natur mit dem Immunserum eingehen und dadurch die quantitativen Beziehungen des Antigens und des Antikörpers stören können, während die Kochsalzlösung dem Ausgleich der Avidität zwischen Antigen und Antikörper kein Hindernis entgegensetzt.

Untersuchungen über die Bindung von Antikörpern in eiweißhaltigen Medien.

Wir haben festzustellen versucht, ob die Reaktion zwischen Antigen und Antikörper durch die Natur des Mediums, vor allem durch seinen Gehalt an Eiweiß und zelligen Elementen irgendwie beeinflußt wird. Bei diesen Versuchen haben wir ebenfalls die Hämolyse als Indikator benutzt. Zunächst versuchten wir, ob sich durch den Zusatz von Leukozyten eine Hemmung oder Verlangsamung der Hämolyse erzielen lasse. Wir hatten dabei aber keine sicheren Ergebnisse. Indessen kann die Hämolysereaktion mit der Phagozytose insofern nicht gut verglichen werden, als die erstere fast stets innerhalb kurzer Zeit abgelaufen ist, während die Phagozytose langsam verläuft

und bei einer Reihe von Antigenen, so auch bei Blutkörperchen, erst im Verlauf der zweiten Stunde den Höhepunkt erreicht. Die Bedingungen für eine unspezifische Absorption des Antikörpers sind daher im Falle der Phagozytose gewiß in höherem Grade vorhanden, als bei der Hämolyse.

Um nun festzustellen, ob der Ambozeptor überhaupt solche Nebenreaktionen mit anderen Eiweißkörpern einzugehen vermag, was uns auch im Hinblick auf seine veränderte Wirkungsweise im Tierkörper von Interesse war, untersuchten wir weiterhin, welchen Einfluß inaktiviertes homologes Serum auf den Verlauf der Hämolysereaktion hat.

Zunächst stellten wir den Grenzwert des hämolytischen Serums gegenüber derselben Hammelblutmenge einmal bei Aufschwemmung in Kochsalzlösung, dann bei Emulsion in der gleichen Menge inaktivierten Hammelserums fest.

Zu diesem Zwecke wurden in einer Versuchsreihe, in der die Summe aller Komponenten = 1,2 ccm war, je 0,5 ccm einer 10%igen Hammelblutaufschwemmung mit 0,03 ccm Komplementserum und 0,57 ccm inaktiviertem Hammelserum versetzt, darauf fallende Ambozeptormengen in 0,1 ccm Flüssigkeit hinzugefügt; eine Parallelreihe wurde statt mit Hammelserum mit den entsprechenden Quantitäten Kochsalzlösung angesetzt. Eine zweite Versuchsreihe wurde mit der gleichen Blut- und Ambozeptormenge angestellt, nur wurde überall 0,3 ccm Komplement hinzugefügt und das Gesamtvolumen der Komponenten durch Auffüllen mit inaktiviertem Hammelserum bezw. mit Kochsalzlösung auf 12 ccm gebracht, so daß also in diesem zweiten Versuch der Ambozeptor und das Antigen 10 mal stärker verdünnt waren. In allen Proben wurde der Ambozeptor dem Gemisch der Komponenten zuletzt beigefügt.

Das Ergebnis dieses Versuches zeigt das folgende Protokoll:

Tabelle 29. Versuch vom 26. 5. 1911. Hämolyseversuch mit Kochsalzlösung und inaktiviertem Hammelserum als Suspensionsmedium.

I. Versuch in einem Gesamtvolumen von 1,2 ccm.

0,5 ccm einer 10%igen Blutkörperchenaufschwemmung wurden mit 0,03 ccm Komplementserum und fallenden Ambozeptordosen mit Kochsalzlösung bezw. inaktiviertem Serum auf 1,2 ccm aufgefüllt.

Versuchsreihe mit Kochsalzlösung			Versuchsreihe mit inaktiviertem Serum		
Ambozeptormenge ccm	Ambozeptorverdünnung	Resultat der Hämolyse	Ambozeptormenge ccm	Ambozeptorverdünnung	Resultat der Hämolyse
0,005	1 : 240	komplett	0,005	1 : 240	komplett
0,002 5	1 : 480	„	0,002 5	1 : 480	„
0,001	1 : 1200	„	0,001	1 : 1200	„
0,000 75	1 : 1600	„	0,000 75	1 : 1600	„
0,000 5	1 : 2400	fast komplett	0,000 5	1 : 2400	fast komplett
0,000 25	1 : 4800	„	0,000 25	1 : 4800	0
0,000 1	1 : 12 000	0	0,000 1	1 : 12 000	0

II. Versuch in einem Gesamtvolumen von 12 ccm.
1 ccm 5%iger Blutkörperchenemulsion wurde mit 0,3 ccm Komplementserum und fallenden Ambozeptordosen mit Kochsalzlösung oder inaktiviertem Serum auf 12 ccm aufgefüllt.

Versuchsreihe mit Kochsalzlösung			Versuchsreihe mit inaktiviertem Serum		
Ambozeptormenge ccm	Ambozeptorverdünnung	Resultat der Hämolyse	Ambozeptormenge ccm	Ambozeptorverdünnung	Resultat der Hämolyse
0,005	1 : 2400	komplett	0,005	1 : 2400	komplett
0,002 5	1 : 4800	„	0,002 5	1 : 4800	„
0,001	1 : 12 000	„	0,001	1 : 12 000	fast komplett
0,000 75	1 : 16 000	„	0,000 75	1 : 16 000	0
0,000 5	1 : 24 000	„	0,000 5	1 : 24 000	0
0,000 25	1 : 48 000	fast komplett	0,000 25	1 : 48 000	0
0,000 1	1 : 120 000	0	0,000 1	1 : 120 000	0
			Kontrolle mit 0,03 ccm Komplement:		
			0,005	1 : 2400	komplett

Der Versuch, besonders sein zweiter Teil zeigt bei einem Vergleich der entsprechenden Serum- und Kochsalzreihen, daß der Ambozeptor bei Verdünnung in einem inaktivierten den Blutkörperchen homologen Serum in seiner Wirkung sehr stark gehemmt wird; er wirkt im Serumgemisch nicht mehr nach der für die Kochsalzlösung eingestellten absoluten Menge, sondern erst bei einer erheblich größeren Dosis. Die beiden Kochsalzreihen ergaben unter sich wiederum vollkommene Übereinstimmung der Resultate: hier kam es nur auf die Ambozeptordosis an. Beim Vergleich der beiden Serumreihen dagegen zeigt sich, wie zu erwarten war, daß der Grad der Hemmung der Ambozeptorwirkung von der Serummenge abhängig ist.

Aus diesem Versuchsergebnis könnte geschlossen werden, daß, sobald in vitro die Versuchsbedingungen den Verhältnissen im Tierkörper angenähert werden, die von Scheller gefundene Gesetzmäßigkeit der Ambozeptorwirkung nach der absoluten Menge keine strenge Geltung mehr hat. Daß übrigens die Hemmung der Hämolyse in diesem Falle nicht etwa allein auf einer Komplementablenkung durch das inaktivierte Serum beruht hat, beweist schon die Kontrolle in der zweiten Reihe des Versuches im größeren Volumen; hier führte noch der zehnte Teil der im Hauptversuch verwendeten Komplementmenge bei Zusatz von 10 ccm inaktivierten Serums und hinreichender Ambozeptordosis zur Hämolyse. Jedoch haben wir zur Sicherstellung dieser Frage auch hier den Bindungsversuch herangezogen, bei dem das Antigen und der Antikörper in den verschiedenen Suspensionsmitteln, Kochsalzlösung und Serum, allein aufeinander einwirkten, das Komplement erst zu den gewaschenen sensibilisierten Elementen zugesetzt wurde, so daß irgendeine Störung seiner Wirksamkeit nicht in Frage kommen konnte.

Zum Versuch wurde 1 ccm einer 5%igen Hammelblutkörperchenaufschwemmung in zwei Versuchsreihen mit fallenden Mengen eines andern Kaninchenantihammelblutserums einmal in 10 ccm Kochsalzlösung, dann in der gleichen Menge inaktivierten Hammelserums 1½ Stunden bei 37° belassen. Der einmal gewaschene Bodensatz wurde mit 0,05 ccm Komplement in 3 ccm Kochsalzlösung der Hämolysierung ausgesetzt.

Das Resultat des Versuches ist im folgenden Protokoll wiedergegeben.

Tabelle 30. Hämolyse nach Sensibilisierung der Blutkörperchen in Kochsalzlösung und in inaktiviertem Serum. (Bindungsversuch.)

I. Kochsalzreihe		II. Serumreihe	
Serumunserummenge ccm	Resultat	Immunserummenge ccm	Resultat
0,01	fast komplett[1])	0,01	fast komplett[1])
0,005	„ [1])	0,005	„ [1])
0,002 5	komplett	0,002 5	komplett
0,001	„	0,001	„
0,000 75	„	0,000 75	fast komplett
0,000 5	„	0,000 5	„
0,000 25	„	0,000 25	0
0,000 1	„	0,000 1	0

Also auch bei dieser Versuchsanordnung wurde im inaktivierten Serum der Ambozeptor durch die gleiche Blutmenge viel schlechter gebunden als in der Kochsalzlösung.

Um den Bedingungen, die bei der Antikörperwirkung im Tierkörper gegeben sind, noch näher zu kommen, haben wir analoge Versuche auch mit aktivem Hammelserum gemacht. Die Ergebnisse dieser Versuche waren den oben dargestellten ähnlich: In den mit Serum angesetzten Proben war mehr Ambozeptor zur Hämolyse erforderlich als in den Röhrchen, in denen Kochsalzlösung zur Suspension der Komponenten gedient hatte.

Nun hatten wir bei diesen Versuchen nicht berücksichtigt, daß zwischen dem Immunambozeptor und einem zum Antigen homologen Eiweißkörper nicht nur unspezifische Adsorbtionsreaktionen, sondern auch eine spezifische Bindung des Ambozeptors an Rezeptoren des Hammelserums eintreten kann.

Um diese Art der Ablenkung des hämolytischen Ambozeptors auszuschließen, haben wir analoge Versuche mit Lösungen von Eiereiweiß und mit heterologem Serum angestellt. Die Versuche mit Eiereiweiß führten zu keinem Resultat, weil es nicht gelang, vollkommen homogene Lösungen zu erzielen und die Blutkörperchen durch Gerinnungsvorgänge in der Eiweißlösung teilweise verklumpt, zu Boden gerissen und der Hämolyse entzogen wurden.

Die Versuche mit heterologem Serum boten wieder durch die notwendige Ausschaltung des in diesem Suspensionsmedium enthaltenen Normalambozeptors einige Schwierigkeiten. Wir verwandten für das System Hammelblutkörperchen-Kaninchenantihammelblutserum ein Kaninchennormalserum, das wir nach ausreichender Inaktivierung durch wiederholtes Mischen mit gewaschenen Hammelblutkörperchen von dem Normalhämolysin zu befreien versuchten. Nach einigen mißglückten Versuchen erhielten wir ein brauchbares Serum durch eine viermalige Vermischung mit den gewaschenen Blutkörperchen aus je 10 ccm Hammelblut. Darauf wurde zur Probe 1 ccm einer

[1]) Infolge starker Verklumpung blieben einige ungelöste Reste zurück.

5 %igen Hammelblutkörperchenemulsion mit 10 ccm dieses Kaninchenserums zwei Stunden bei 37° belassen, dann abzentrifugiert und mit 0,05 Komplement vermischt; es erfolgte keine Hämolyse mehr.

Nun wurde zum Versuch 1 ccm einer 5%igen Hammelblutkörperchenaufschwemmung in zwei Reihen mit 10 ccm der Suspensionsmedien, Kochsalzlösung und Kaninchenserum gemischt, und dann die gleichen fallenden Mengen des Immunserums hinzugefügt. Die gut gemischten Proben wurden während 30 Minuten bei Zimmertemperatur belassen, dann auszentrifugiert und der Bodensatz nach einmaliger Waschung in 3 ccm Kochsalzlösung mit 0,05 ccm Komplement versetzt.

Das Ergebnis der Hämolysereaktion nach zwei Stunden zeigt die folgende Tabelle.

Tabelle 31. Versuch vom 27. 9. 1911. Hämolyse nach Sensibilisierung in Kochsalzlösung und Normalserum (Bindungsversuch).

Menge des Ambozeptors ccm	Hämolyse in der Kochsalzreihe	Hämolyse in der Serumreihe
0,002 5	komplett	komplett
0,001	„	nicht komplett
0,000 75	„	Spuren
0,000 5	„	0
0,000 25	gering	0
0,000 1	0	0
—	0	0

Das Ergebnis dieses Versuches zeigt zwar eine etwas geringere Differenz der beiden Reihen wie sie bei dem in Tabelle 30 wiedergegebenen Experiment zutage trat, im Prinzip aber stimmen die Resultate beider Versuche überein; offenbar wird die spezifische Absorption des hämolytischen Ambozeptors durch die Anwesenheit größerer Mengen indifferenten Serums erheblich gehemmt.

Allgemeine Ergebnisse.

Das Ergebnis unserer Reagenzglasversuche läßt sich dahin zusammenfassen, daß der von Scheller behauptete Unterschied in der Abhängigkeit der Wirkung des Antikörpers und des Komplements von ihrer Konzentration im Reaktionsmedium tatsächlich besteht, daß sich ferner die phagozytären Antikörper, die Tropine, in dieser Beziehung grundsätzlich ebenso verhalten wie die hämolytischen, allerdings nur im Bindungsversuch, während im direkten Phagozytoseversuch in einem Gemisch von Antiserum, Antigen und Leukozyten, diese quantitativen, von der Verdünnung unabhängigen Beziehungen zwischen Antigen und Antikörper nicht deutlich zutage treten. Der Grund dafür liegt wohl zum Teil in der durch eine Verdünnung bedingten Änderung der für den Verlauf der Reaktion sehr wichtigen räumlich-mechanischen Verhältnisse zwischen den korpuskulären Reaktionselementen. Als weitere Ursache der Störung der quantitativen Antikörperwirkung bei der Phagozytose kommt

vielleicht auch eine nicht spezifische Absorption des Antikörpers durch die Leukozyten und Eiweißkörper im Reaktionsgemisch in Betracht. Auch beim hämolytischen Ambozeptor treten die direkt proportionalen quantitativen Beziehungen zum Antigen nur in der indifferenten Kochsalzlösung zutage; sobald aber zur Suspension der Komponenten Serum verwendet wurde, auch solches, welches keinerlei spezifische Reaktionen mit dem Antikörper eingehen konnte, so änderten sich sowohl im direkten Hämolyseversuch wie bei der vorausgeschickten Sensibilisierung die quantitativen Verhältnisse derart, daß nun zur Sättigung der gleichen Antigenmenge mehr Ambozeptor erforderlich war, und zwar, wie es scheint, eine um so größere Menge, je größer die Serumquantität war. Danach wirkt also der Ambozeptor unter diesen Bedingungen auch nicht mehr nach der absoluten Menge.

Dieses Ergebnis scheint uns deshalb bemerkenswert zu sein, weil es mit der im Tierkörper gegenüber Bakterien zutage tretenden Wirkungsweise des Ambozeptors gewisse Analogien aufweist. Auch im Organismus kann der Antikörper wohl nur unter ganz bestimmten, den Verhältnissen im Reagenzglase nahestehenden Bedingungen z. B. in der Peritonealhöhle entsprechend seiner Menge auf das Antigen wirken, wie aus den Choleraversuchen zu erkennen ist. Im Peritoneum stehen sich Antigen und Antikörper unter relativ sehr geringer Beeinflussung durch die Säfte und Gewebe des Organismus gegenüber und können ihre Avidität fast zu ebenso maximaler Entfaltung bringen wie im Reagenzglase in Kochsalzlösung. Tritt aber in vitro Serum an die Stelle der Kochsalzlösung und werden im Organismus die Körpergewebe und -säfte zwischen die Komponenten geschaltet, so kann eine erhebliche Änderung ihrer quantitativen Beziehung eintreten. Die Natur des Lösungsmittels spielt demnach bei den Immunitätsreaktionen eine erhebliche Rolle, sie dürfte auch im Tierkörper bei der Bindung des Antikörpers an das Antigen in Frage kommen, doch haben hier, wie oben ausführlich erörtert wurde, außerdem noch die lokalen Verhältnisse, durch die das Zusammentreffen von Antikörper und Antigen mehr oder weniger erschwert wird, den größten Einfluß.

Zwischen Antikörper, Antigen und Suspensionsmittel bestehen sowohl in vivo wie in vitro Beziehungen physikalisch-chemischer Natur, für die sich auch in der Chemie analoge Beispiele finden lassen. Wir möchten diese Beziehungen als Spezialfälle des Verteilungsgesetzes auffassen. In der physikalischen Chemie gibt es wohl keine absoluten Gegensätze zwischen Vorgängen, die sich ausschließlich nach Maßgabe des Prozentgehaltes der Komponenten abspielen, und solchen, in denen nur die absolute Menge der Stoffe in Betracht kommt, wohl aber kann eine Reaktion innerhalb gewisser Grenzen ganz überwiegend in dem einen oder im anderen Sinne verlaufen.

Ein annäherndes Beispiel bietet sich uns vielleicht in dem Verhalten des Chloroforms gegenüber Äther und Wasser. Schüttelt man Chloroform mit Äther in einer wässerigen Lösung, so liegt der Verteilungskoeffizient dieses Stoffes so sehr zu gunsten des Äthers, zu dem das Chloroform eine sehr große Affinität hat, daß es annähernd quantitativ darin übergeht; die Menge des Wassers hat in diesem Falle innerhalb gewisser Grenzen keinen wesentlichen Einfluß auf die Menge des im Äther sich lösenden Chloroforms. Dieses Beispiel würde ein Analogon zum Verhalten des

Ambozeptors darstellen, der sich in wässeriger Lösung mit Blutkörperchen zusammengebracht infolge seiner starken Affinität unabhängig von der Menge des Lösungsmittels nahezu quantitativ an das Antigen bindet. Würde man aber für die Probe statt des indifferenten Wassers als Lösungsmittel eine andere Flüssigkeit nehmen, so kann sich der Verteilungskoeffizient und damit das Ergebnis des Versuches ganz anders gestalten. So besitzt auch der Antikörper bei gleichzeitiger Anwesenheit von viel Serum anscheinend keine so absolute Affinität zu dem Antigen, wird also nicht in seiner Totalität vom Antigen gebunden, sondern in einer Menge, die von der Differenz seiner Affinitäten zum Antigen und zum Serum und der Menge des letzteren abhängig ist. Bekanntlich wird vielfach eine verschiedene „Avidität" von Antikörpern angenommen; dieselbe wird sich natürlich in allen derartigen Versuchen geltend machen, indem der Antikörper, je höher seine Avidität ist, um so vollständiger an das Antigen gebunden werden wird.

Die Affinität spielt bei diesen Vorgängen die ausschlaggebende Rolle; sie erklärt auch die Wirksamkeit des Komplements, das ja, wie aus allen anderen Versuchen bekannt ist, nicht die maximale Verwandtschaft zum Antigen besitzt wie der Ambozeptor. Ein annäherndes Analogon für seine Wirkungsweise könnte in dem Verhalten des Alkohols gegenüber Äther und Wasser gesehen werden. In einer Mischung dieser drei Komponenten ist der Verteilungskoeffizient nicht so überwiegend zugunsten des Äthers wie im vorigen Beispiel mit Chloroform. Infolgedessen geht von gleichen Alkoholmengen um so weniger in den Äther, der hier das Antigen darstellen mag, über, je mehr Wasser in dem Gemisch vorhanden ist. Von der Wassermenge, mithin von der Konzentration des Alkohols im ganzen Gemisch, ist die Menge des im Äther sich lösenden Alkohols stark abhängig; ganz ähnlich verhält es sich auch mit dem Komplement.

Mit dieser Auffassung stimmt es gut überein, daß nach den Versuchen von Liefmann und Andreew (a. a. O.) auch die chemischen Hämolytika teils überwiegend nach der absoluten Menge, teils nach der Konzentration wirken.

Wenn wir nun zum Ausgangspunkt unserer Untersuchungen zurückkehren und uns fragen, welche Gesichtspunkte sich aus den Resultaten derselben für die Serumtherapie menschlicher Erkrankungen ergeben, so möchten wir zunächst darauf hinweisen, daß unsere Untersuchungen bei ihrer Beschränkung auf eine kleine Auswahl experimenteller Infektionsprozesse ein sehr unvollständiges Material für Schlußfolgerungen nach dieser Richtung hin darstellen. Vielleicht lassen sich daraus in einigen Punkten aber doch Beziehungen zu der spezifischen Therapie menschlicher Infektion erkennen.

Am leichtesten sind wohl die Verhältnisse bei den septikämischen Krankheiten zu beurteilen; je mehr sich eine für die Serumtherapie in Betracht kommende menschliche Krankheit dem Typus der Septikämie nähert, um so besser dürften sich die bei ihr vorliegenden Verhältnisse mit den von uns bei Tieren studierten Septikämien vergleichen lassen. Wir möchten annehmen,

daß in diesem Falle auch beim Menschen ein Schwellenwert für die Wirkung des Serums vorhanden sein wird, unterhalb dessen der Antikörper überhaupt nicht zur Geltung kommen kann. Der ganze Körper muß bis zu einem bestimmten Grade mit Antistoffen durchtränkt sein. Dies kann beim Menschen, wie aus anderen Untersuchungen bekannt ist, schnell nur durch die intravenöse Injektion großer Serummengen erreicht werden; als Ersatz kommt nach den Untersuchungen von Morgenroth die intramuskuläre Einspritzung in Frage. Die subkutane Seruminjektion dürfte bei großen Tieren und beim Menschen wegen der langsamen Resorption der Antikörper zur passiven Immunisierung viel weniger geeignet sein. Schon beim Kaninchen wirkt sie weit schlechter als die intravenöse Serumimpfung. Nur bei ganz kleinen Tieren, wie bei der Maus, liegen die Resorptionsverhältnisse offenbar günstiger.

Wie schon hervorgehoben wurde, ist es aber nicht nötig anzunehmen, daß bei verschiedenen Tierarten genau dieselbe Konzentration des Antikörpers den Schwellenwert seiner Wirkung darstellt, obwohl sich in den von uns untersuchten Fällen eine auffallende Übereinstimmung ergab. Im Tierkörper kommt auch die Energie der Zellen und Gewebssäfte in Betracht; so könnte die Aktivität der phagozytären Zellen bei verschiedenen Tieren gegenüber gleich stark sensibilisierten Bakterien verschieden sein.

Bei den Pneumokokken haben wir mittels des Reagenzglasversuches einen Anhaltspunkt zu gewinnen gesucht, welche Serumkonzentration voraussichtlich im menschlichen Körper noch wirksam sein dürfte und wie sich bei gleichem Antikörpergehalt die phagozytäre Wirkung im Menschen- und Mäuseblut verhält. Wir haben zu diesem Zwecke Pneumokokken der Phagozytose durch Blutleukozyten von Mensch und Maus ausgesetzt. Wir bedienten uns einer Modifikation der Methode von Leishman-Wright und waren dabei bestrebt, die Bedingungen des Experiments den im Organismus obwaltenden Verhältnissen möglichst nahe zu bringen, indem wir dem Gemisch der Komponenten aktives homologes Serum hinzufügten und die Blutbewegung durch langsames Rotieren der Röhrchen während des Aufenthaltes im Brutschrank nachzuahmen versuchten.

Zum Versuche wurden die in Zitratlösung aufgefangenen und zweimal gewaschenen Blutkörperchen mit gleichen Teilen einer 24stündigen Bouillonkultur hochvirulenter Pneumokokken, ebenso viel frischem homologem Serum und derselben Menge von Verdünnungen eines mäßig starken nicht karbolisierten Pferdeimmunserums in kleinen Reagenzgläschen gemischt. Von allen Komponenten kamen 0,05 ccm zur Anwendung. Die Röhrchen wurden darauf mit paraffinierter Watte verschlossen und auf einer Scheibe befestigt, die im Brutschrank bei 37° in eine langsame Bewegung um eine horizontale Achse versetzt wurde. Das Resultat der Phagozytose nach einstündiger Bebrütung zeigt die folgende Tabelle 32 (S. 74).

Bei diesem Versuche zeigte es sich, daß der Ausfall der Phagozytose nach dieser Methode entschieden stärker war als bei Einhaltung der regulären Wrightschen Technik, die wir in einigen ähnlichen Versuchen benutzt hatten. Es zeigte sich ferner, daß Menschenleukozyten den Pneumokokken gegenüber im ganzen eine größere Aktivität besaßen als Mäusezellen und daß bei einer Verdünnung des Immunserums von 1 : 60 im Menschenblut noch eine ziemlich starke Phagozytose vorhanden war, während das Mäuseblut dabei nur noch eine geringe Aufnahme der Keime erkennen ließ. Es scheint uns erwünscht, weitere Versuche dieser Art vorzunehmen und damit

Tabelle 32. Pneumokokkenphagozytose nach Leishman-Wright mit Menschen- und Mäuseblut. Versuch vom 12. 5. 1911.

Versuchsreihe mit Menschenblut			Versuchsreihe mit Mäuseblut		
Immunserum ccm	Menge der übrigen Komponenten	Resultat der Phagozytose	Immunserum ccm	Menge der übrigen Komponenten	Resultat der Phagozytose
0,01 (0,05 Verdünnung 1 : 5)	0,05 Pneumokokkenkultur	Phagozytose in den meisten Leukozyten, sehr stark	0,01 (0,05 Verdünnung 1 : 5)	0,05 Pneumokokkenkultur	Phagozytose deutlich, aber nicht in allen Zellen und im Grade mäßig
0,003 3 (0,05 Verdünnung 1 : 15)	0,05 Blut (Mensch) 0,05 aktives Menschenserum	Phagozytose stellenweise noch sehr gut, nicht in allen Zellen	0,003 3 (0,05 Verdünnung 1 : 15)	0,05 Blut (Maus) 0,05 aktives Mäuseserum	Phagozytose noch hier und da, aber gering
— (Kontrolle m. 0,05 Kochsalzlösung)		keine sichere Phagozytose	— (Kontrolle m. 0,05 Kochsalzlösung)		keine Phagozytose

die Wirkung derselben Sera in vivo zu vergleichen. Unsere Schutzversuche mit Pneumokokken an der Maus wurden übrigens mit einem etwas stärkeren Serum angestellt, daß seines Karbolgehaltes wegen zu diesem Versuch nicht gebraucht wurde[1]).

Eine ähnliche Probe, ob nämlich phagozytäre Antikörper in wirksamen Mengen im Kreislauf des passiv immunisierten Organismus nachzuweisen sind, läßt sich in der Weise anstellen, daß man einen direkten Phagozytoseversuch mit Serum und Leukozyten des immunisierten Tieres, am besten nach Leishman-Wright, ausführt. Solche Versuche sind von Staal[2]) an Schweinen, von Kandiba an Mäusen, die passiv gegen Rotlauf immunisiert worden waren, ausgeführt worden und haben ein deutlich positives Resultat ergeben.

Es würde nach unserer Meinung von Interesse sein, bei Patienten, die mit Streptokokken- und Pneumokokkenserum behandelt wurden, gleichartige Versuche zu machen. Nach dieser Methode würde sich auch der Unterschied in der Resorption von bakteriotropem Serum nach subkutaner und intravenöser Applikation beim Menschen ermitteln lassen.

Zu bedenken ist aber für die Praxis der Serumtherapie, daß beim Menschen in einem Punkte andere Verhältnisse vorliegen als bei unseren Tierversuchen. Bei unseren Untersuchungen mit Streptokokken und Pneumokokken besaßen die Keime stets eine maximale Virulenz für die Versuchstiere. Der Mensch dagegen besitzt diesen Bakterien gegenüber nicht nur gewisse natürliche Schutzstoffe (wohl Plasmastoffe = Leukine nach den Untersuchungen von Much und Dold), sondern es werden bei ihm, wenigstens bei Pneumokokkeninfektionen, im Laufe der Krankheit auch spezifische Immunkörper gebildet, deren Wirkung sich zu der des künstlich

[1]) Zurzeit verfügen wir über Pneumokokkensera, die in weit stärkeren Verdünnungen wirksam sind (vergl. Neufeld und Händel, Berliner klin. Wochenschr. 1912).

[2]) Zentralbl. f. Bakt. Orig. Bd. 49, S. 226.

zugeführten Serums addieren wird. Ob bei der Streptokokkeninfektion auch solche Immunstoffe auftreten, ist wohl noch nicht sicher erwiesen.

In bezug auf die Wirkung des Pneumokokkenserums gehen wir von der Überzeugung aus, daß auch die Pneumonie insofern zu den septikämischen Affektionen gehört, als bei ihr die Gefahr nicht so sehr in den lokalen Veränderungen als in der Allgemeininfektion besteht. Im übrigen lassen sich ja, wie wir jetzt wissen, die septikämischen Infektionen von den lokal verlaufenden nicht so streng scheiden. Wir wissen, daß z. B. beim Typhus ein dauernder Übergang von Keimen in den Kreislauf und die Organe eine große Rolle spielt, während andererseits bei septikämischen Krankheitserregern, z. B. bei den Pestbazillen vielfach auch mehr lokal bleibende Infektionen beobachtet werden.

Je mehr der Charakter einer lokalen Infektion in den Vordergrund tritt, um so mehr dürften sich die Verhältnisse denen nähern, die wir bei der Cholerainfektion des Meerschweinchens gefunden haben. Hier kommt nur der Bruchteil der Antikörper zur Geltung, der in den lokalen Krankheitsherd übergeht, in diesem Falle ins Peritoneum. Bei der menschlichen Cholera spielt sich der Prozeß wohl vorwiegend in der Darmwand ab. Über die Aussichten, hierher schnell genügende Mengen des Antiserums zu bringen, ist experimentell nichts bekannt, sie dürften wohl nicht günstiger, sondern ungünstiger sein als bei der peritonealen Lokalisation des Prozesses. In manche Gebiete des Körpers, z. B. den Subduralraum, gehen (nach Versuchen mit Tetanusantitoxin) offenbar nur in sehr geringem Maße Antikörper aus dem Kreislauf über, dementsprechend ist bei der epidemischen Meningitis die Serumtherapie nur bei lokaler, subduraler Applikation des Antikörpers erfolgreich.

Die Annahme, daß die mit zahlreichen antiinfektiösen Seris beobachteten Mißerfolge auf der Art der Antikörper beruhen, scheint uns für keinen Fall bewiesen zu sein; wir haben zunächst alle Ursache, anzunehmen, daß dabei die quantitativen Verhältnisse die Hauptrolle spielen. Neuere Untersuchungen zeigen auch immer deutlicher, daß die antiinfektiösen Sera bei genügender Menge zugleich auch entgiftend wirken müssen. Daß die Phagozytose in diesem Sinne wirkt, ist wohl stets angenommen worden. Aber auch die bakteriolytischen Ambozeptoren wirken in gewissem Grade entgiftend, indem sie einmal, wie neuere, von der Frage der Bakterienanaphylaxie ausgehende Beobachtungen gezeigt haben, den schweren Schädigungen entgegenwirken, die dem Organismus offenbar durch frei in den Körpersäften kreisende Bakterien jeder Art ohne Rücksicht auf ihre etwa vorhandenen spezifischen Gifte drohen, und weil sie andererseits, wie Pfeiffer und Bessau bewiesen haben, die giftigen Endotoxine zu ungiftigen Produkten abzubauen imstande sind.

Wir glauben daher, daß die Zukunft der Serumtherapie mehr von der Überwindung der durch die quantitativen und Verteilungsverhältnisse gegebenen Schwierigkeiten als von der Erzeugung qualitativ anderer Immunsera abhängen wird.

Zusammenfassung.

Aus den vorstehenden Versuchen glauben wir folgende Schlüsse ziehen zu können:

Die Immunsera gegen drei Arten septikämischer Krankheitserreger, gegen den Pneumokokkus, den Streptokokkus und den Rotlaufbazillus stehen in ihrer quantitativen Schutzwirkung fast ausschließlich zu dem Gewicht der Versuchstiere in Beziehungen und sind innerhalb gewisser Grenzen nicht abhängig von der Menge der Infektionsdosis. Diese Sera wirken im Tierkörper also vorwiegend nach ihrer Konzentration.

Der Schutzeffekt ist nicht in der Weise von der Serumkonzentration abhängig, daß mit allmählich steigendem Antikörpergehalt des Organismus auch seine Immunität langsam steigt, sondern dieselbe tritt bei einem gewissen, von der Wertigkeit des Immunserums bestimmten „Schwellenwerte" der Antikörperkonzentration ziemlich plötzlich in voller Ausbildung zutage.

Der Schwellenwert jener wirksamen Konzentration ist bei zweien dieser Sera, beim Pneumokokken- und Streptokokkenserum, für zwei gleich empfängliche Tierarten, die Maus und das Kaninchen, im Verhältnis zum Körpergewicht ungefähr der gleiche. Die Art der Serumapplikation scheint nur insofern eine Rolle zu spielen, als dadurch die Resorption beeinflußt wird; dagegen ist es zur Erzielung der vollen Serumwirkung nicht erforderlich, daß Serum und Kultur an derselben Stelle injiziert werden.

Im Gegensatz hierzu ist beim Choleraimmunserum im Meerschweinchenversuch die Schutzwirkung direkt von der Menge des Antigens abhängig; andererseits wird sie auch von der Art der Applikation stark beeinflußt. Die Schutzwirkung hängt somit nicht von der Erreichung eines Schwellenwertes der Konzentration im Organismus ab, sondern ist in erster Linie durch die lokalen Verhältnissen der Infektion bedingt.

Zwischen dem Modus der Infektionen (septikämische Allgemeininfektionen ohne starke Toxinwirkung der Erreger — lokale Infektion mit deutlicher Giftwirkung der Vibrionen) und dem Wirkungsmechanismus der Antikörper gegen die betreffenden Erreger (Wirkung nach der Verdünnung im Organismus ohne Beziehung zur Antigenmenge — Wirkung vorwiegend lokal, Beziehung zur Antigenmenge) scheint demnach ein Zusammenhang zu bestehen.

Die Behauptung, daß der hämolytische Ambozeptor in vitro nach der absoluten Menge, das Komplement dagegen vorwiegend nach der Verdünnung wirkt, besteht zu Recht.

Diese Beziehungen lassen sich als ein besonderer Fall des physikalisch-chemischen Verteilungsgesetzes deuten. Der agglutinierende Antikörper (für Blutkörperchen) wirkt ebenfalls nach der absoluten Menge.

Das Tropin wirkt dagegen im direkten Phagozytoseversuch vielfach mehr nach dem Grade seiner Konzentration, nicht nach seinem absoluten Gehalt in dem Gemisch der Komponenten. Beim Bindungsversuch in Kochsalzlösung wirkt aber auch der phagozytäre Antikörper ebenso wie der hämolytische und agglutinierende nur nach seiner absoluten Menge und unabhängig vom Gesamtvolumen.

Diese Differenzen in der Antikörperwirkung unter den verschiedenen Bedingungen werden zum Teil auf räumlich-mechanische, zum Teil auf physikalisch-chemische Ver-

hältnisse zurückgeführt. Unter den letzteren scheint die Affinität der Lösungsmittel zu den Reaktionskörpern eine sehr wichtige Rolle zu spielen, indem der Antikörper nur in einem indifferenten Medium seiner maximalen Affinität zum Antigen ungehemmt folgen kann, wie im Hämolyseversuch, im Bindungsphagozytoseversuch und annähernd auch im Pfeifferschen Versuch. Unter diesen Bedingungen bindet sich die Titerdosis ganz an die entsprechende Antigenmenge: der Antikörper wirkt der absoluten Menge nach. Ist er aber durch Affinitäten zu anderen Körpern gehemmt, so bindet sich die Titerdosis erst bei einer größeren absoluten Menge an die Antigeneinheit; in diesem Falle tritt eine mehr oder weniger starke Abweichung von der Wirkungsweise nach der absoluten Menge ein.

Über „perkutane“ Infektion mit Spirochaeten des russischen Rückfallfiebers, der Hühnerspirochaetose und der Kaninchen-Syphilis.

Von

Dr. phil. **C. Schellack,**

ständ. Mitarbeiter am Kaiserl. Gesundheitsamte.

(Hierzu Tafel I.)

Neben eine umfangreiche Literatur über Infektionen mit Bakterien durch normale unverletzte Epithelien hindurch sind erst seit 1907 Angaben über diese Infektionsart bei Protozoen-Krankheiten getreten. Sie beschränken sich auf Trypanosomen- und Spirochaeten-Krankheiten. Uhlenhuth, Hübner und Woithe (1907) waren die ersten, die bei Dourine durch Einreiben von trypanosomenhaltigem Blut auf der geschorenen Haut in einigen Fällen Infektionen erzielten; Manteufel gelang dann 1907 die perkutane Infektion zuerst bei Rückfallfieber. Diese Versuche sind mehrfach wiederholt und bestätigt worden, von anderen Autoren und auch bei anderen Trypanosomen-Krankheiten als Dourine; perkutane Infektionen mit Spirochaeten dagegen sind nur bei Rückfallfieber (ausführliche Angaben folgen unten) und, soweit ich sehe, bei Syphilis (von Neißer und seinen Mitarbeitern mit negativem Erfolg) versucht worden.

Die folgenden Untersuchungen, die auf Anregung von Herrn Prof. Schuberg im Protozoen-Laboratorium des Kaiserl. Gesundheitsamtes unternommen wurden, beschäftigen sich ebenfalls nur mit Spirochaetosen, und zwar sollten einmal perkutane Infektionsversuche außer bei Rekurrens auch bei Hühnerspirochaeten und Kaninchen-Syphilis ausgeführt werden, sodann sollte versucht werden, einige Klarheit über die Eingangspforten der Spirochaeten bei dieser merkwürdigen Infektionsart zu erzielen. Über den letzteren Punkt fehlen bis jetzt jegliche Angaben.

Material.

Bei den Versuchen mit Rückfallfieber wurde in allen Fällen der schon seit Jahren im Gesundheitsamte fortgezüchtete Stamm russischer Rekurrens benutzt. Als Versuchstiere dienten Ratten und Mäuse. Bemerkt sei, daß alle Tiere, bei denen der mikroskopische Nachweis von Spirochaeten im Blut nicht gelang, trotzdem als infiziert dann

angesehen wurden, wenn bei der etwa 2—3 Wochen nach dem Versuch erfolgten Nachimpfung mit demselben Stamm sich Immunität herausstellte. Kompliziert wird diese Nachprüfung etwas, wenn zur Nachimpfung ein virulenterer Stamm benutzt wird: dann kann auch bei einer Ratte, die eine mikroskopisch nicht nachgewiesene Infektion durchgemacht hat, eine leichte Nachinfektion auftreten, die sich aber durch ihre Dauer und die Menge der Spirochaeten sofort von der Normalinfektion unterscheidet.

Das Syphilis-Material wurde in dankenswerter Weise von den Herren Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. Uhlenhuth und Dr. Mulzer zur Verfügung gestellt: es handelt sich um den in mehreren Veröffentlichungen des Gesundheitsamtes erwähnten Stamm, der zur Zeit der Versuche bereits viele Passagen in Kaninchen-Hoden durchgemacht hatte.

I. Perkutane Infektionsversuche.

1. Bei russischem Rückfallfieber.

Eine kurze Zusammenstellung der maßgebenden Literatur, insbesondere auch eine Aufzählung der Versuche, über die wir bis jetzt verfügen, sei voraufgeschickt. Auf die Fütterungsversuche wird in diesem Abschnitt nicht eingegangen.

Manteufel (1907, 1909) führt folgende Fälle auf (beziehen sich auf russische und afrikanische Spirochaeten):

3 Ratten (mit der Schere an der Bauchhaut geschoren) mittels Gummifinger eingerieben mit infektiösem Blut . . . . . 3 Ratten infiziert.
6 Ratten (ebenso geschoren) Blut aufgeträufelt . . . . . 6 Ratten infiziert.
2 Ratten Blut in Konjunktiva geträufelt . . . . . 1 Ratte infiziert.

Bohne (1908):

3 Mäuse (mit Schere geschoren) aufgeträufelt (amerikanische Rekurrens) 2 Mäuse infiziert.

Die zahlreichsten Versuche sind von Nattan-Larrier (1909) gemacht worden. Die Fälle, in denen er Blut auf die kurz vorher rasierte Bauchhaut aufgestrichen hat, seien übergangen.

Bei 2 Ratten (Haut mit Äther oder Seifenlösung und Kochsalzlösung gewaschen, um die Haut benetzbar zu machen) Blut aufgeträufelt . 2 Ratten infiziert.
7 Ratten, Schwanzspitze in ein Gefäß mit Blut eingetaucht keine Ratte infiziert.
5 Ratten, Innenfläche der Ohrspitze Blut aufgeträufelt . keine Ratte infiziert.
16 Ratten, Blut in Maul . . . . . 16 Ratten infiziert.
14 Ratten, Blut in Rektum . . . . . 14 Ratten infiziert.
12 Ratten, Blut in Vagina . . . . . 12 Ratten infiziert.
5 Ratten, Blut auf Penis . . . . . 3 Ratten infiziert.
8 Ratten, Blut auf Konjunktiva . . . . . 8 Ratten infiziert.

Ferner sind Versuche desselben Autors wichtig, die Daten über die Zeit des Eindringens in das Blut geben sollen: die infizierten Tiere wurden getötet und ihr Blut auf neue Ratten verimpft: es wurde festgestellt, daß bei perkutanen Versuchen auf der Bauchhaut die Spirochaeten nach ca. 24 Stunden, nach Verfütterung, Infektion

per vaginam usw., also durch Schleimhäute, die Spirochaeten schon nach 4 Stunden durch Blutverimpfung nachweisbar sind.

Schuberg und Kuhn (1911) gelang die Infektion von Ratten mit Rekurrens, indem sie 5 Exemplare von Stomoxys calcitrans, die 2—3 Stunden vorher Rekurrensblut gesogen hatten, auf der unverletzten Haut zerquetschten.

Schließlich sind noch einige wenige Versuche von Gozóny (1911) zu erwähnen, dem die Infektion mit Rückfallfieber-Spirochaeten durch Konjunktiva, Vagina, Darm und Körperhaut (in letzterem Fall bei Einreiben!) gelang.

Auf eine wichtige Arbeit Nattan-Larriers (1911), über die Vererbbarkeit der Rekurrensinfektion bei Ratten, die in gewisser Weise unser Thema berührt, wird weiter unten eingegangen werden.

Technisch erschien es mir bei meinen Versuchen wesentlich, um wirklich jede Verletzung auszuschließen, daß die Haare nicht kurz vorher mit der Schere geschoren wurden, da, falls auch nur ein Haar etwas gerissen wird, eine genügende Verletzung gegeben ist. Auch das Waschen, das Nattan-Larrier ausführt, um die Haut leichter benetzbar zu machen, wurde (außer in den Versuchen Tabelle I, 38—40, Tabelle V, 22—29) vermieden, da es vielleicht ähnlich wirken wird, wie etwa nachheriges Einreiben mit dem infektiösen Blut. Die Ratten wurden entweder gar nicht behandelt, oder, um die Haut zum Schneiden auf dem Mikrotom verwenden und das Epithel selbst durch die Lupe prüfen zu können[1]), 3—4 Tage vor dem Versuch rasiert. Die Versuchstiere blieben immer so lange aufgespannt, bis das aufgetragene Blut ganz eingetrocknet war. Kollodium wurde auf das angetrocknete Blut nicht aufgetragen.

Zur Nachprüfung und Bestätigung der oben (Seite 79) aufgeführten grundlegenden Versuche, auf denen die Annahme von der Möglichkeit einer perkutanen Infektion bei Spirochaeten beruht, wurden die folgenden Versuche ausgeführt. Tabelle I, 7—12; der größte Teil der 3—4 Tage vorher rasierten Bauchfläche wurde bis an die Haare hinan mit Blut bestrichen, das etwa $^1/_2$ Stunde einwirkte, bis es antrocknete: von den 6 Ratten machten 5 eine starke Infektion durch. Das Ergebnis entspricht der Zahl nach dem der oben genannten Autoren.

Ganz im Gegensatz dazu stehen aber die Versuche I, 24—28; die sorgfältig rasierte und ausgeheilte Bauchhaut wurde auf einer Fläche von Markstück-Größe, die durchaus keine sichtbaren Verletzungen aufwies, etwa eine Stunde lang der Einwirkung aufgeträufelten infektiösen Blutes ausgesetzt: keine Ratte wurde infiziert. Wichtig ist, zu bemerken, daß das benutzte Blut durchaus lebenskräftige und bewegliche Spirochaeten enthielt. In der Mitte zwischen diesen Extremen stehen die Versuche I, 29—37 (neben 4 positiven Fällen 5 negative) und II, 1—12. Die letzteren wurden zu einem besonderen Zweck in etwas anderer Art angestellt, was aber hier nicht in Frage kommt; sie wurden an Mäusen ausgeführt, deren Bauchhaut unrasiert war. Das Blut war auf die Haare in etwa Markstück-Größe aufgeträufelt, wurde aber nach bestimmten Zeiträumen durch Abwischen mit in Alc. absol. getränktem Wattebausch

[1]) Das letztere ist unbedingt notwendig dann, wenn die Ratten Flöhe und Läuse haben, die durch das Saugen natürlich Wunden verursachen. Läuse pflegen sich sogar auf der rasierten Bauchhaut festzusetzen.

Tabelle I.

Perkutane Infektionsversuche an der Bauchhaut von Ratten.

Ratten mindestens 3—5 Tage vorher rasiert. Blut nur mehrmals nacheinander aufgeträufelt und angetrocknet.

Nr.	Datum des Versuchs	Spirochaeten-nachweis im Blut	Spirochaeten im Blut am wievielten Tage nach Versuch?	Größe der bestrichenen Stelle	Blut wie lange Zeit einwirken lassen?	Bemerkungen
1	19. 9. 11	negativ	—	etwa linsengroß	etwa 30 Minuten	hochvirulenter Spirochaetenstamm: Nachimpfung am 2. 10. bei 1, 3—5, 9 positiv (Ratten gingen an Spirochaetose ein); bei 2, 7, 12 negativ, bei 8, 10, 11 schwache eintägige Infektion, die zum Tode führte.
2	19. 9. 11	positiv	am 6. Tag schon stark infiziert			
3	19. 9. 11	negativ	—			
4	19. 9. 11	„	—			
5	19. 9. 11	„	—			
6	19. 9. 11	„	—			
7	19. 9. 11	positiv	am 6. Tag schon sehr stark infiziert	Größter Teil der Bauchfläche		
8	19. 9. 11	„	„			
9	19. 9. 11	negativ	—			
10	19. 9. 11	positiv	am 6. Tag schon stark infiziert			
11	19. 9. 11	„	am 7. Tag die ersten Spirochaeten			
12	19. 9. 11	„	am 6. Tag schon sehr stark infiziert			
13	17. 7. 11	negativ	—	halb linsengroß	über eine Stunde	Am 4. 8. 11 waren tot 13, 14, 15, 18, 19, 20 und ein unbezeichnetes Tier, so daß Nachimpfung nicht vorgenommen werden konnte. Die übrigen wurden zu den folgenden Versuchen 29 bis 37 benutzt, dann nachgeimpft, und zwar haben alle Tiere 29—37 eine Spirochaeten-Infektion durchgemacht, waren also nicht immun.
14	17. 7. 11	„	—			
15	17. 7. 11	„	—			
16	17. 7. 11	„	—			
17	17. 7. 11	„	—			
18	17. 7. 11	„	—	linsengroß		
19	17. 7. 11	„	—			
20	17. 7. 11	„	—			
21	17. 7. 11	„	—			
22	17. 7. 11	„	—			
23	17. 7. 11	„	—			
24	17. 7. 11	„	—	so groß wie ein Markstück		
25	17. 7. 11	„	—			
26	17. 7. 11	„	—			
27	17. 7. 11	„	—			
28	17. 7. 11	„	—			
29	2. 8. 11	positiv	7. Tag	nicht ganz so groß wie ein Markstück	etwa eine Stunde	—
30	2. 8. 11	„	5. Tag			— Sehr schwache Infektion!
31	2. 8. 11	„	10. Tag			—
32	2. 8. 11	„	7. Tag			—
33	2. 8. 11	negativ	—			Nachimpfung positiv. Alle Ratten an Spirochaeten gestorben.
34	2. 8. 11	„	—			
35	2. 8. 11	„	—			
36	2. 8. 11	„	—			
37	2. 8. 11	„	—			
38	5. 10. 11	„	—	etwa linsengroß	über eine Stunde	Haut kurz vor Versuch einige Mal mit Äther vorsichtig abgewaschen. Nachimpfung positiv.
39	5. 10. 11	„	—			
40	5. 10. 11	„	—			

entfernt, also nicht antrocknen gelassen (8 positive, 4 negative). Es gelingen also in wechselndem Prozentsatz manchmal fast alle Versuche, manchmal gar keine. Das Ergebnis steht in einem gewissen Gegensatz zu der oben angeführten Literatur, nach der es scheint, als ob im allgemeinen alle perkutanen Infektionsversuche auf der Bauchhaut gelingen.

Vielleicht hat die vorsichtige Technik allein, die selbstverständlich alle vermeidbaren Verletzungen auszuschalten hatte, die Zahl der positiven Fälle in den oben angeführten Versuchen schon vermindert. Viel wichtiger aber erscheinen mir in dieser Beziehung die folgenden beiden Umstände.

Es ließ sich schon aus den eben genannten Versuchen vermuten, daß die Größe der bestrichenen Fläche nicht unwesentlich ist für die Zahl der gelingenden Versuche. Bei der Versuchsreihe I, 7—12, welche die meisten positiven Ergebnisse zeigte, war der größte Teil der Bauchhaut mit Spirochaetenblut bestrichen. Volle Bestätigung bringt die Gesamtheit der Tabelle I: z. B. in den Versuchen 1—12 war dasselbe Blut benutzt, hatte gleich lange eingewirkt, und die Ratten waren ganz gleich behandelt. Von 6 Tieren, denen ein etwa linsengroßer Blutstropfen auf die Haut aufgetragen war, erkrankte 1; von den anderen 6, denen der größte Teil der Bauchfläche bestrichen war, erkrankten 5. Auch aus den anderen angeführten Versuchen ergibt sich ohne weiteres, daß die Zahl der gelingenden Versuche mit der Größe der bestrichenen Fläche zunimmt.

Tabelle II. Versuche perkutaner Übertragung mit kleinen Bluttröpfchen („Spritzern").

(Bauchhaut der Ratten drei Tage vorher rasiert. Nach dem Eintrocknen des ersten Tropfens wurde ein gleich großer Tropfen infektiösen Blutes noch einmal an dieselbe Stelle gebracht.)

Nr.	Datum des Versuchs		Bemerkungen
1	26. 4. 10	negativ bis 9. 5.	Der aufgebrachte Tropfen war etwa stecknadelkopfgroß.
2	26. 4. 10	„	
3	26. 4. 10	„	
4	26. 4. 10	„	Der aufgebrachte Tropfen war etwa halb-linsengroß.

Tabelle II gibt einen Versuch wieder, durch den geprüft werden sollte, ob durch winzig kleine Bluttröpfchen, „Spritzern", wie sie beim Arbeiten mit dem Blut im Laboratorium (etwa Töten einer Ratte) häufig vorkommen, die Infektion übertragen wird. Der Versuch verlief negativ. Das Ergebnis liegt natürlich nicht allein in der geringen Größe der bestrichenen Fläche, sondern ist auch in dem zu schnellen Eintrocknen der Tröpfchen begründet.

Die bisher erwähnten Versuche sind, wie vorweg genommen sei, für die Entscheidung der Frage, welche Eintrittspforte die Spirochaeten durch das Epithel benutzen, von Wichtigkeit: es ergibt sich ohne weiteres, daß die Spirochaeten nicht durch jeden beliebigen Haarbalg (wie etwa die Ankylostomen in den Loosschen Versuchen) oder durch jede beliebige Zelle eindringen können, da sie nicht auf jeder

beliebigen Stelle der Bauchhaut, sondern erst auf einer größeren Fläche eine Eintrittspforte finden.

Man könnte einwenden, daß in den Versuchen mit einem kleineren Tropfen die benutzte Hautstelle nicht genügend benetzt wurde — dem widersprechen die Versuche I, 38—40, V, 22—29, in denen eine leichte Benetzbarkeit der Haut (sogar Auseinanderfließen der Tropfen) durch vorsichtiges Abreiben mit Äther erzielt war.

Auch die Virulenz des Stammes der Spirochaeten ist für die Zahl der gelingenden Versuche maßgebend. Anders ist wenigstens das Mißlingen aller Versuche in I, 13—28, nicht zu erklären. Die Versuche wurden an gleich behandelten Ratten mit demselben Blut ausgeführt; die Spirochaeten waren massenhaft im Blut vorhanden, sowohl vor dem Aufstreichen als auch, wie zufällig festgestellt wurde, noch während des Versuchs. Andererseits stand es fest, daß der Stamm nicht sehr virulent war: die Ratten gingen nie ein. Durch vielfache schnelle Weiterverimpfung von Ratte zu Ratte wurde er so virulent gemacht, daß die Ratten an der Infektion eingingen, und zu I, 1—12 und allen späteren Versuchen benutzt. Die Zahl der positiven Versuche wurde etwas größer.

Tabelle III. Zeitversuche.

Das aufgestrichene Blut wurde nach der in der ersten Reihe angegebenen Zeit mit Alcohol abs. entfernt.

Nr.	Dauer der Einwirkung des infizierten Blutes	Erfolg	Spirochaeten im Blut am wievielten Tag nach Versuch?	Datum des Versuchs
1	3 Minuten	negativ	—	28. 11. 09
2	3 „	positiv	4. Tag	11. 1. 10
3	4½ „	„	4. „	11. 1. 10
4	5 „	„	6. „	18. 11. 09
5	8 „	„	5. „	28. 11. 09
6	10 „	„	4. „	18. 11. 09
7	12 „	„	6. „	28. 11. 09
8	20 „	„	6. „	28. 11. 09
9	21 „	negativ	—	18. 11. 09
10	40 „	„	—	28. 11. 09
11	60 „	„	—	28. 11. 09
12	120 „	positiv	5. Tag	18. 11. 09

Bemerkung: Alle Versuche außer 2 und 3, die an Ratten gemacht wurden, an Mäusen. Versuche vom gleichen Datum mit demselben Blutmaterial. Größe der bestrichenen völlig unbehandelten nicht rasierten Stellen etwa wie ein Markstück.

In den Versuchen der Tabelle III sollte festgestellt werden, wie lange Zeit die Spirochaeten zum Durchdringen der Haut gebrauchen. Es wurde in der Weise verfahren, daß das auf die nicht geschorene, gänzlich unbehandelte Bauchhaut aufgeträufelte Blut nach bestimmten Zeitabschnitten mit reichlich absolutem Alkohol wieder abgerieben und völlig entfernt wurde. Es ergab sich die überraschende Tatsache, daß diese Art der Desinfektion schon nach 3 Minuten eine In-

fektion nicht mehr aufzuhalten vermag, eine Tatsache, die natürlich für die Arbeiten im Laboratorium von Wichtigkeit ist. Es scheint nun aber, daß die Spirochaeten nach dieser Zeit noch keineswegs im Blutstrom kreisen: dagegen sprechen einmal die oben angeführten Versuche von Nattan-Larrier, der durch die Weiterverimpfung des Blutes perkutan infizierter Ratten eine Infektion erst nach 24 Stunden erzielen konnte. Man vergleiche ferner Tabelle IV meiner Versuche, die in derselben Weise angestellt wurden.

Tabelle IV. Überimpfung des Blutes perkutan infizierter Ratten auf andere Ratten nach bestimmten Zeitintervallen.

Nr.	Überimpfung nach welcher Zeit auf gesunde Ratten?	Datum des Versuchs	Spirochaeten-Nachweis im Blut	Bemerkungen
1	3 Minuten	27. 4. 11	negativ bis 8. 5. 11	Nachimpfung am 16. 5. 11 positiv
2		26. 3. 12	„ „ 12. 4. 12	„ „ 12. 4. 12 „
3	6 Minuten	27. 4. 11	„ „ 8. 5. 11	„ „ 16. 5. 11 „
4		26. 3. 12	„ „ 12. 4. 12	„ „ 12. 4. 12 „
5	9 Minuten	27. 4. 11	„ „ 8. 5. 11	„ „ 16. 5. 11 „
6		26. 3. 12	„ „ 12. 4. 12	„ „ 12. 4. 12 „
7	12 Minuten	27. 4. 11	„ „ 8. 5. 11	„ „ 16. 5. 11 „
8		26. 3. 12	„ „ 12. 4. 12	„ „ 12. 4. 12 „
9	15 Minuten	27. 4. 11	† am 27. 4. 11	—
10		26. 3. 12	negativ bis 12. 4. 12	Nachimpfung am 12. 4. 12 positiv
11	1 Stunde	26. 3. 12	negativ bis 12. 4. 12	„ „ 12. 4. 12 „
12				
13	2 Stunden	26. 3. 12	„ „ 12. 4. 12	„ „ 12. 4. 12 „
14				
15	4 Stunden	26. 3. 12	„ „ 12. 4. 12	„ „ 12. 4. 12 „
16				

Für diese Annahme sprechen auch die auffällig vielen negativen Ergebnisse in den Versuchen der Tabelle V (S. 85), in denen nach dem gewöhnlichen Aufstreichen und Eintrocknen des Blutes die betreffende Hautstelle zum Zwecke mikroskopischer Untersuchung herausgeschnitten wurde. Die Ratten vertragen diese Operation recht gut und können weiterhin lebend auf Spirochaeten untersucht werden.

Wie aus Tabelle V hervorgeht, ist die Zahl der positiven Versuche wirklich auffällig gering (2 positive Fälle neben 27 negativen), und eine Erklärung außer in der geringen Größe der bestrichenen Fläche nur noch in der Annahme gegeben, daß die Spirochaeten das herausgeschnittene Hautstück nach den angegebenen Zeiten meist noch nicht verlassen haben. In einem Falle jedoch (V, 5) waren sie nach 30—45 Minuten bereits hindurchgedrungen (was gegen die Nattan-Larrierschen Versuche spricht), und in einem zweiten Falle (V, 1) nach 3 Stunden. In den mit einem hochvirulenten

Tabelle V. Versuche, bei denen nach Aufbringen des Blutes auf eine Stelle der Bauchhaut das betreffende Hautstück herausoperiert wurde (zwecks Versilberung).

Ratten sämtlich mindestens 3—4 Tage vor dem Versuch rasiert.

Nr.	Datum des Versuchs	Spirochaeten-Nachweis im Blut	Spirochaeten im Blut am wievielten Tag nach Versuch?	Nachimpfung	Größe der bestrichenen Stelle	Stelle herausgeschnitten nach welcher Zeit?	Wie lange Blut einwirken lassen?
1	19. 10. 09	positiv	3. Tag	—	etwa wie ein Markstück	nach 3 Stunden	mehrere Mal aufgestrichen bis Eintrocknen
2	22. 5. 11	negativ	—	10. 8. positiv	erbsengroß	30 – 45 Minuten	30—45 Minuten
3	22. 5. 11	„	—	„	„	„	„
4	22. 5. 11	„	—	? gestorb. 8. 11	„	„	„
5	22. 5. 11	positiv	5. Tag	—	„	„	„
6	17. 7. 11	negativ	—	am 1. 8. 11 positiv, 12 nicht nachgeimpft; † am 1. 8. 11.	halberbsengroß bis erbsengroß	nach 1 Stunde	1 Stunde
7	17. 7. 11	„	—				
8	17. 7. 11	„	—				
9	17. 7. 11	„	—				
10	17. 7. 11	„	—				
11	17. 7. 11	„	—				
12	17. 7. 11	„	—				
13	17. 7. 11	negativ	—				
14	19. 9. 11	„	—	Nachimpfung 2. 10. 11 positiv (Ratten am Spirochaetose gestorben)	halberbsengroß	nach 30 Miminuten	30 Minuten
15	19. 9. 11	„	—				
16	19. 9. 11	„	—				
17	19. 9. 11	„	—				
18	19. 9. 11	„	—				
19	19. 9. 11	„	—				
20	19. 9. 11	„	—				
21	19. 9. 11	„	—				
22	5. 10. 11	„	—	—	etwa erbsengroß	nach 1 Stunde	1 Stunde (die Haut war kurz vor dem Versuch einige Mal mit Äther abgewaschen, Nachimpfung positiv)
23	5. 10. 11	„	—	—			
24	5. 10. 11	„	—	—			
25	5. 10. 11	„	—	—			
26	5. 10. 11	„	—	—			
27	5. 10. 11	„	—	—			
28	5. 10. 11	„	—	—			
29	5. 10. 11	„	—	—			

Stamm ausgeführten Versuchen V, 14—21 war nach 30 Minuten noch keine einzige Infektion erfolgt, während in den Parallel-Versuchen mit demselben Blut und derselben Größe der bestrichenen Stelle I, 1—6 (auch gleicher Zeit der Einwirkung des Blutes) ohne Herausschneiden des betreffenden Stückes wenigstens eine Infektion erfolgte.

Zu den angeführten Versuchen von Nattan-Larrier, eine Infektion durch das Epithel des Penis hindurch auszuführen, sind einige ergänzende Versuche gemacht worden.

Tabelle VI. Spitze des Penis mit infektiösem Blut bestrichen; bei 1—3 einmal, bei 4 zweimal, dann antrocknen lassen (ca. $^1/_4$ Stunde).

Nr.	Datum des Versuchs	Spirochaeten-Nachweis im Blut	Bemerkungen
1	4. 4. 11	negativ bis 22. 4.	Durch Nachimpfung am 27. 4. infiziert
2	4. 4. 11	„	
3	4. 4. 11	„	
4	22. 5. 11	negativ bis 3. 6.	Durch Nachimpfung am 10. 7. infiziert

Es sei bemerkt, daß diese Versuche naturgemäß sehr schwer an dem herausgedrückten Penis so vorzunehmen sind, daß nicht umgebende Partien mit Haaren usw. von dem Blut benetzt werden, wenn der Penis plötzlich wieder zurückgezogen wird. Nur in 4 Fällen konnte das mit Sicherheit erreicht werden, und auffälligerweise sind diese 4 Fälle negativ. Ich möchte das, wie vorweg bemerkt sei, darauf zurückführen, daß dies geschützte Epithel sehr intakt ist: jedenfalls sind diese Fälle nicht durch die allgemein ausgesprochene Annahme Nattan-Larriers zu erklären, daß eine perkutane Infektion mit Rekurrensspirochaeten um so leichter erfolge, je dünner und gefäßreicher die betreffende Hautstelle sei.

Tabelle VII. Spitze des Penis mit infektiösem Blut bestrichen; Penis wurde eingezogen, daher wurde auch das behaarte Epithel der Umgebung ganz wenig benetzt.

Nr.	Datum des Versuchs	Spirochaeten-Nachweis im Biut	Bemerkungen
1	22. 5. 11	negativ bis 1. 6.	Durch Nachimpfung am 10. 7. infiziert
2	22. 5. 11	„	
3	22. 5. 11	„	Immun! Durch Nachimpfung am 10. 7. nicht infiziert

Auch von den in Tabelle VII, 1—3 dargestellten Versuchen verliefen 2 Fälle negativ und der dritte positive Fall zeigte eine so schwache Infektion des Blutes, daß sie mikroskopisch übersehen wurde. Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die Versuche von Manteufel (1908), dem es in mehr als 40 Fällen kein einziges Mal gelang, die Rekurrensinfektion bei Ratten durch den Coitus zu übertragen.

Manteufel und Nattan-Larrier machen darauf aufmerksam, daß das Krankheitsbild bei perkutan infizierten Ratten gegenüber dem durch Injektion einer größeren Blutmenge erzeugten insofern abgeändert sei, als die Inkubationszeit vergrößert, die Menge der Spirochaeten verringert und die Krankheitsdauer verlängert sei (vergl. hierzu die Quetschversuche von Schuberg und Kuhn (S. 389) bei Rekurrens). Das bestätigen die von mir angeführten Versuche im allgemeinen. Jedoch sei bemerkt, daß, wenn die mit infektiösem Blut bestrichene Hautfläche sehr groß ist, die Überschwemmung des Blutes mit Spirochaeten auch sehr stark werden kann: z. B. in den Versuchen I,

7, 8, 10, 12 war die Infektion ebenso stark wie bei Ratten, die mit der Spritze geimpft sind. Auffällig ist, daß auch in den eben genannten Fällen, bei denen ein hochvirulenter für Ratten tödlicher Stamm verwandt wurde, die Tiere am Leben blieben, trotzdem die Infektion sich sehr lange hinzog und auch Rückfälle auftraten. Es tritt also zu den oben genannten Veränderungen des Krankheitsbildes bei perkutaner Infektion hinzu, daß eine gewisse Virulenzabschwächung eintritt.

2. Perkutane Infektionsversuche bei Hühnerspirochaetose.

Außer positiv verlaufenen Fütterungsversuchen (Uhlenhuth, Bickel und Groß (1908) sind mit Spir. gallinarum keine Infektionsversuche durch unverletzte Epithelien vorgenommen worden.

Die auf den Tabellen VIII und IX verzeichneten Versuche sind an zwei verschiedenen Körperstellen der Hühner ausgeführt worden. Die einen an der Brusthaut in einer wenig befiederten, unter dem Flügel liegenden Region (die demnach gegen kleine Verwundungen gut geschützt ist), die anderen an dem durch dickes Epithel und starke verhornte Schichten geschützten Kamm.

Beim Kamm kommt noch hinzu, daß er im allgemeinen schwer benetzbar ist, so daß das Blut an vielen Stellen gar nicht haftet.

Tabelle VIII. Perkutane Übertragungsversuche mit Spirochaeta gallinarum an der Brusthaut von Hühnern unter dem Flügel.

Huhn-Nr.	Datum des Versuchs	Spirochaeten im Blut?	Spirochaeten im Blut am wievielten Tage nach Versuch?	Größe der bestrichenen Stelle	Wie lange Blut einwirken lassen?	Bemerkungen
673	1. 4. 10	positiv	6. Tag	mindestens erbsengroß	½ Stunde. Wiederholt Blut aufgetragen	—
695	29. 4. 10	„	5. Tag	erbsengroße Stelle	wie bei dem vorigen	—
696	29. 4. 10	„	7. Tag			—
697	29. 4. 10	„	12. Tag!!			—
708	1. 4. 11	„	5. Tag	mehr als erbsengroße Stelle	wie bei den vorigen	—
710	1. 4. 11	negativ	—			Die Hühner 710, 712 wurden nochmals benutzt zu den Versuchen 710*, 712*. Zu 713 siehe Bemerkung bei Tabelle IX.
712	1. 4. 11	„	—			
713	1. 4. 11	„	—			
710*	25. 4. 11	„	—	mehr als erbsengroße Stelle	wie bei den vorigen	Bei Nachimpfung nicht immun.
712*	25. 4. 11	negativ (immun!)	—			Bei Nachimpfung immun!
717	25. 4. 11	negativ	—			Bei Nachimpfung nicht immun.
718	25. 4. 11	„	—			„
719	25. 4. 11	positiv	6. Tag			—

Aus Tabelle VIII 673—719 ergibt sich wieder wie bei den Rückfallfieber-Versuchen, daß die Zahl der gelingenden Versuche (7 unter 13) unter gleichbleibenden Bedingungen sehr schwankt; es gelingen wieder manchmal fast alle Versuche, manchmal

fast gar keine. Daß das verwendete Blut stark infektiös war, auch in den überwiegend negativen Versuchsreihen (708—719), ist dadurch erwiesen, daß jedesmal mindestens ein positiver Versuch zu verzeichnen ist. Hinzu kommt auch, daß der Virulenzgrad hier eine weniger große Rolle spielt. Denn auch bei den perkutan infizierten Hühnern tritt die Krankheit äußerst akut auf, hat durchschnittlich dieselbe Dauer wie bei gewöhnlicher Infektionsart (durch Zecken oder Injektion) und führt dann meist zum Tode, seltener zur Immunität. Allerdings ist die Inkubationszeit auch hier bedeutend verlängert (in einem Falle Tabelle VIII, 697 12 Tage!); durchschnittlich erfolgt die Infektion, wenn die bestrichene Stelle etwa erbsengroß ist, am 6. Tage. Auch bei den von Schuberg und Kuhn (1911) ausgeführten Übertragungen der Rekurrens durch Stich von Stomoxys calcitrans betrug die Inkubationszeit etwa 6 Tage.

Die Inkubationszeit ist eben, wie experimentell genügend erwiesen, im wesentlichen abhängig von der Menge der eindringenden Parasiten, und sie würde auch hier verringert werden können, wenn man eine größere Fläche bestreichen würde. Versuche über den Einfluß der Größe der bestrichenen Fläche sind bei Hühnerspirochaeten nicht ausgeführt worden.

Tabelle IX. Perkutane Übertragungsversuche mit Spir. gallinarum am Kamm von Hühnern.

Huhn-Nr.	Datum des Versuchs	Spirochaeten-Nachweis im Blut	Spirochaeten im Blut am wievielten Tage nach Versuch?	Größe der bestrichenen Stelle	Blut wie lange einwirken lassen?	Bemerkungen
666	1. 4. 10	negativ	—	1 große Zacke des Kammes bestrichen	½ Stunde. Blut mehrere Mal nachgestrichen	Nachimpfung negativ.
671	1. 4. 10	„	—	erbsengroßer Fleck am Kamm		
675	1. 4. 10	„	—	5 Zacken des Kammes		
687	1. 4. 10	„	—			
692	20. 4. 10	„	—	ein nicht ganz markstückgroßer Fleck am Lappen unter dem Schnabel	ebenso	Nachimpfung nicht ausgeführt.
693	20. 4. 10	„	—			
704	1. 4. 11	„	—	etwa erbsengroßer Fleck	ebenso	Versuch 704* wiederholt an 704 Nachimpfung am 10. 7. positiv.
705	1. 4. 11	positiv	7. Tag			—
706	1. 4. 11	negativ	—			Versuch 706* wiederholt an 706 mit positivem Ergebnis, also das Tier war nicht immun.
707	1. 4. 11	„	—			Siehe Bemerkung unten.*)
704*	25. 4. 11	„	—	ebenso	ebenso	Nachimpfung positiv.
706*	25. 4. 11	positiv	6. Tag			—
714	25. 4. 11	„	6. Tag			Nachimpfung positiv.
715	25. 4. 11	negativ	—			„
720	25. 4. 11	„	—			„

*) Bemerkung zu 707 und 713 (Tabelle VIII). An beiden Hühnern wurde der gleiche Versuch nochmals ausgeführt, ohne daß Spirochaeten im Blut auftraten. Bei Nachimpfung war eines der beiden immun! Nicht zu entscheiden welches, da beide die Nummern verloren hatten.

Die Versuche am Kamm, Tabelle IX, 666—720 waren einigermaßen überraschend, da unter 15 Versuchen nur 3 positive zu verzeichnen sind. Die Versuche sind in 4 Serien ausgeführt (wie in allen Tabellen wurde auch hier unter demselben Datum dasselbe infektiöse Blut verwendet). Man muß immer in Rücksicht ziehen, daß in einer gewissen Anzahl von Fällen eine nicht normale Verletzung an den benutzten Stellen vorhanden sein wird, die man übersieht oder nicht erkennen kann. Um so auffälliger ist der geringe Prozentsatz der vom Kamm aus infizierten Tiere. Die verschiedene Art des Epithels muß hier doch von Einfluß sein, wenn nicht die geringere Benetzbarkeit des Kammes eine Rolle spielt. Wesentlich ist aber, daß an beiden so verschiedenartigen Epithelien die Infektion gelingt.

3. Perkutane Infektionsversuche bei Kaninchensyphilis.

Es lag nahe, zu versuchen, ob auch die Spirochaeten der Kaninchensyphilis die Fähigkeit besitzen, durch die normale Haut in gleicher Weise durchzudringen wie bei Rekurrens- und Hühnerspirochaeten, zumal in dem von Uhlenhuth und Mulzer in vielen Passagen fortgezüchteten Stamm ein hochvirulentes und massenhaftes Spirochaetenmaterial zur Verfügung stand. Ich halte es für mehr als wahrscheinlich, daß ein sicherer ätiologischer Zusammenhang zwischen den von obigen Autoren bei Kaninchen erzeugten Krankheitsprodukten und den in ihnen gefundenen Spirochaeten besteht, und daß die Krankheit Syphilis ist. Auf die Belege dafür brauche ich hier nicht einzugehen[1]).

Für die menschliche Syphilis besteht der fast allgemein anerkannte Satz, daß zum Zustandekommen einer Infektion eine Läsion des Epithels vorhanden sein muß. Freilich sind die experimentellen Grundlagen dafür ziemlich mangelhaft. Neißer und seine Mitarbeiter (1911) sagen auf Grund ihrer Affenversuche: „Einfaches Einreiben von virulentem Material auf die unverletzte Oberfläche der Tonsillen, der Nasenschleimhaut und der Konjunktiva ist resultatlos geblieben.“ Genaueres über die Versuche selbst, Zahl derselben usw. ist nicht angegeben. Levaditi und Roché (1909) sprechen, ohne allerdings auf diesbezügliche Versuche zu verweisen, dieselbe Ansicht aus, daß die Spirochaeten unfähig seien, Haut und Schleimhäute wie etwa der Pestbazillus zu durchdringen, vielmehr seien kleine, möglichst wenig blutende Wunden dazu nötig. Voraussetzung für alle folgenden Versuche ist die Annahme, die auch überall bestätigt ist, daß ein lokalisierter Primäreffekt auftritt. Von Interesse ist deswegen die Angabe Cosanets (1903), daß das Syphilisgift die gesunde Schleimhaut passieren könne, ohne Primäraffekte zu erzeugen. Ich entnehme diese Angabe der Neißerschen Arbeit und kann über etwaige Versuche des Autors nichts Näheres aussagen, da mir seine Arbeit nicht zugänglich war. Es ist jedenfalls die einzige Angabe, die ich darüber finde, daß die Syphilis die Schleimhäute durchdringen könne.

[1]) Erwähnen möchte ich, daß ich viele genaue vergleichende Messungen der Spirochaete der menschlichen und Kaninchen-Syphilis ausgeführt habe (Messungen der Minimal- und Maximallängen und der Längen bei Querteilungsprozessen) und nur unwesentliche Unterschiede aufgefunden habe, die jedenfalls nicht zu einer Arttrennung der beiden Spirochaeten berechtigen. Es ist selbstverständlich, daß bei der Kleinheit der Organismen daraus allein natürlich nicht der sichere Schluß gezogen werden kann, daß es sich tatsächlich um dieselbe Art handelt.

Bei der Ausführung der Versuche ist es notwendig darauf zu achten (worauf Uhlenhuth und Mulzer hinweisen), daß die Spirochaeten gut beweglich sind. Man findet nämlich in zurückgehenden Prozessen häufig und massenhaft völlig bewegungslose Spirochaeten, die an bestimmten Stellen lokalisiert sind; sie fehlen an noch im Wachstum begriffenen syphilitischen Prozessen der Kaninchen oder sind darin wenigstens nicht in solchen Massen vorhanden.

Die Versuche wurden an Epithel des Skrotalsackes, des Penis und der Augen der Kaninchen unternommen; makroskopische Verletzungen und Entzündungen wurden ausgeschlossen. Es empfiehlt sich, bei den Versuchen am Penis die Kaninchen längere Zeit vor dem Versuche von anderen Tieren getrennt zu halten, da andernfalls, vor allem nach dem Zusammensetzen mit Männchen, der Penis fast immer stark entzündet oder leicht verletzt ist.

Die erste Serie der Versuche wurde in der Weise angesetzt, daß ein kleines Stückchen (ewa halb erbsengroß) syphilitischen Hodenmaterials von Kaninchen an die innere Seite der beiden Skrotalsäcke ohne Druck oder Reibung angelegt und dann ein Lappen des Skrotalsacks darüber gelegt und mit einem Leukoplast-Pflaster festgehalten wurde. Teilweise wurde ein Tröpfchen physiologischer Kochsalzlösung auf das Stückchen aufgeträufelt, um eine bessere Benetzung zu erzielen. In einigen Fällen wurde das Pflaster solange haften gelassen, bis es von selbst abfiel, in anderen wurde es einige Tage nach Beginn des Versuches entfernt. Es ergab sich nun allerdings, daß diese Versuche für eine typische perkutane Infektion, wie sie etwa bei Rekurrensspirochaeten stattfindet, nicht heranzuziehen sind. Denn die Erweichung des Epithels des Skrotalsacks durch das sich zersetzende Stück infektiösen Materials kann soweit gehen, daß eine leichte Mazeration und sogar Durchlöcherung des Epithels stattfinden kann. Das tritt natürlich immer erst nach längerer Zeit ein, Durchlöcherung wenigstens wahrscheinlich erst dann, wenn das Stück stark zersetzt ist und infolgedessen die Spirochaeten auch bereits abgestorben sind. Deswegen ist es immerhin erwähnenswert, daß in 8 Versuchen dieser Art (Kaninchen 1—9), d. h. 15 Fällen (da in der Regel auf beiden Skrotalsäcken ein Versuch angesetzt war), 4 positiven Erfolg hatten (Kaninchen 1 und 3 je an einer Seite, 4 an beiden Seiten). Die harten Ödeme, die zunächst winzig klein waren, lagen im Bindegewebe unter dem Epithel (das selbst nicht verschiebbar an ihnen festhaftete), wurden im Laufe der Zeit größer und glichen vollständig den von Uhlenhuth und Mulzer erzeugten Prozessen. Es ist immerhin interessant, daß bei solch leichter Mazeration, vielleicht nur Erweichung des Epithels, bei der experimentellen Syphilis eine Weiterimpfung gelang, da sonst sogar bei Skarifikation und Taschenbildung häufig der Erfolg ausbleibt.

In den Versuchen 10—13 wurde jede Mazeration durch Aufkleben eines Pflasters vermieden. Das infektiöse Material war mit einem Skalpell auf einer Holzplatte zu einem feinen Brei zerschnitten und zerhackt worden, sodann nur soviel Kochsalzlösung zugesetzt, daß die breihaltige Konsistenz erhalten blieb. Dieser Brei wurde auf eine etwa bohnengroße Stelle der Skrotalhaut aufgetragen und frei liegen gelassen; er haftet ziemlich fest, so daß man am nächsten Tage fest angetrocknete Stückchen findet. Die Versuche 10, 12, 13 verliefen negativ, dagegen trat bei 11 eine kleine harte

Schwellung auf, die aber nur etwa stecknadelkopfgroß war. Sie war von gleich großen anderen echt syphilitischen Erscheinungen nicht zu unterscheiden, aber die Untersuchung auf Spirochaeten verlief negativ, konnte auch nicht wiederholt werden, da die Erscheinung nach der Punktion zurückging. Sie darf daher als syphilitisch nicht betrachtet werden, aber es muß darauf hingewiesen werden, daß, wie es eine nicht geringe Zahl von Fällen gibt, in denen das Syphilis-Virus selbst bei Injektion in den Hoden nicht haftet, so auch typische winzig kleine Primäraffekte vorkommen werden, die nach einiger Zeit, manchmal in wenigen Tagen, definitiv zurückgehen. Damit muß bei allen diesen Versuchen gerechnet werden, vor allen Dingen bei den folgenden Versuchen am Penis und Auge, wo kleine Affekte leicht übersehen werden können. Es ist deshalb zu vermuten, daß die Zahl positiver Versuche in der Tat höher gewesen sein mag als angegeben. Dazu kommt, daß sicher mit einer weiteren Steigerung der Virulenz des Stammes für Kaninchen auch die Zahl der Erfolge wachsen wird.

Eine weitere Reihe von Versuchen (14—21) beschäftigt sich mit der auch praktisch wichtigen Frage, ob die Spirochaeten das unverletzte Epithel des Präputialsackes durchdringen können. Bei Kaninchen 14 wurde ein Stückchen syphilitischen Hodenmaterials in den Präputialsack eingeschoben, bei 15—18 frisch punktiertes spirochaetenhaltiges klares Serum, bei 19—21 einige Tropfen mit der Kapillare abgesogener Saft aus zerkleinertem Brei (siehe Seite 90) eingeträufelt. Sämtliche Versuche waren auffälligerweise negativ (es liegt nahe, sie mit den negativen Versuchen bei Rekurrens am Rattenpenis zu vergleichen, bei denen, wie späterhin ausgeführt wird, wahrscheinlich der Grund des Mißlingens darin zu suchen ist, daß das Epithel des Penis und Präputialsackes vollständig unverletzt ist).

Die wichtigsten Versuche sind die am Auge ausgeführten. Es wurde sorgfältig darauf geachtet, daß die Augen makroskopisch unverletzt und keine Entzündungen vorhanden waren. Auch wurde nach dem Versuch genau geprüft, ob nicht durch die Einbringung des Materials in das Auge rein mechanisch Entzündungen oder Verletzungen verursacht wurden. Das war bis nach Ablauf einiger Tage niemals der Fall, wie es ja auch bei der angewandten Versuchstechnik zu erwarten war. Entweder wurde ganz fein zerhackter und mit Kochsalzlösung etwas verdünnter Brei von syphilitischem Hoden (aus dem Innern entnommen, stets ohne Epithel und Haare und Stücke verhärteter Schankeroberfläche) vorsichtig unter das etwas abgehobene untere Lid eingebracht (22—25), oder mit Kapillaren abgesogener spirochaetenhaltiger Saft auf das Auge geträufelt (26—38). Der Brei war meist schon nach einigen Minuten zum größten Teil aus dem Auge wieder herausgetreten und wurde dann bald (außer bei 25, 26) mit einem Wattebausch entfernt.

Unter 17 Kaninchen (deren beide Augen in Versuch genommen wurden) sind bis jetzt 8 deutlich lokal erkrankt, 5 nur an je einem Auge, 3 an beiden Augen (22, 26, 27, 35, 37 an einem Auge, 31, 32, 36 an beiden). Bei 22 und 35, die nach den Protokollen zweifellos syphilitische Affekte hatten, mißlang der Spirochaetennachweis bis jetzt wegen der Kleinheit der Affekte.

Höchst bemerkenswert ist der Umstand, daß sämtliche (bis auf die Ausnahme an der Nickhaut) Erkrankungen in ihren ersten Stadien an derselben Stelle lokalisiert

waren, nämlich unmittelbar auf dem sog. Kornealfalz (Übergangsstelle von Kornea in Sklera), dort wo der Musculus recti superior oder inferior mit seinen äußersten Ausläufern (die bekanntlich bis an den Kornealfalz reichen) beginnt; in zwei Fällen war außerdem noch ein Primäraffekt auf der Nickhaut (auf der freien mehr dem Auge zugewandten Fläche) vorhanden. Mazerationen oder Entzündungen durch die eingebrachte Substanz sind, wie besonders hervorgehoben werden muß, gerade an diesen fast ganz freiliegenden Stellen am wenigsten zu erwarten, vor allem nicht auf der Nickhaut. Primär war in keinem Falle eine Trübung der Kornea zu erkennen, was wiederum auffällig ist, da ja sonst das syphilitische Virus auf der skarifizierten Kornea sehr leicht haftet; wohl aber traten in einigen Fällen kurz nach dem Auftreten von Ödemen am Kornealfalz Trübungen der anliegenden Teile der Kornea auf, die sich teilweise bis über die Mitte der Kornea erstreckten. Niemals erkrankte auch die Konjunktiva primär, in 5 Fällen aber sekundär am Lid gerade über den infizierten Stellen des Augapfels. Gründe, weshalb die Lokalisation des Virus gerade an den erwähnten Stellen statthat, vermag ich nicht anzugeben. Ob die erst sehr spät auftretenden Erkrankungen am zweiten Auge (bei 31, 32, 36 — ungefähr 2 bis 4 Monate nach dem Versuch!) von einer vom ersten Auge ausgegangenen Allgemeininfektion herrühren, ist schwer zu entscheiden. Jedenfalls waren sonstige Erscheinungen einer Allgemeininfektion an beiden Tieren nicht zu beobachten, und es ist zu bedenken, daß kleine leicht zu übersehende Affekte sich manchmal außerordentlich lange ohne wesentliches Wachstum (unter periodischem Zurückgehen) zu erhalten vermögen.

Die Erscheinungen begannen auch hier winzig klein mit scharf umschriebenen durchsichtigen oder etwas gelblichen harten Erhebungen, unterlagert von einem stark vergrößerten dichten Gefäßnetz — später nahm das letztere so zu, daß die ganze Schwellung fleischrot aussah. In allen Fällen waren massenhaft typische Spirochaeten zu finden. Es ist schon darauf hingewiesen, daß gerade an den Augen manchmal typische sehr kleine Schwellungen auftraten, die schnell wieder verschwanden, ehe Spirochaeten nachweisbar waren: natürlich sind nur solche Fälle als positiv angeführt, in denen der Spirochaetennachweis gelang.

Auf die wichtige Frage, ob die Spirochaeten durch das unversehrte Epithel oder vielleicht durch kleine Verletzungen, die sozusagen normal am Auge vorkommen, eindringen, wird unten im Zusammenhange mit den Beobachtungen bei Rekurrens und Hühnerspirochaetose etwas näher eingegangen werden; jedenfalls liegt die Frage nahe, ob dieser Infektionsweg bei der menschlichen Syphilis praktisch wohl auch in Frage kommt. Sichere Fälle von Primäraffekten im Auge unter Ausschließung von vorherigen Verletzungen sind natürlich aus der Literatur oder Praxis nur schwer oder gar nicht aufzufinden; ich möchte aber doch auf einen Fall hinweisen, der im Zusammenhang mit obigen Versuchen erhöhtes Interesse gewinnt. Ich verdanke ihn der Liebenswürdigkeit des Herrn Privatdozenten Dr. Pinkus in Berlin. Einem dem letzteren bekannten Arzte gelangte durch Husten eines Patienten mit syphilitischen Affekten im Rachen Substanz ins Auge. Die Untersuchung des Patienten erfolgte am 10. 5. 1907, am 17. 6. 1907 trat bei dem Arzt ein langgestrecktes syphilitisches Ödem an der unteren Konjunktiva auf, späterhin papillöse Exantheme am Kopf. Aus

letzteren wurden Spirochaeten nachgewiesen; auch bei dem Patienten war der Spirochaetennachweis positiv gewesen.

Vielleicht ist es nicht ganz ausgeschlossen, daß man, durch obige Versuche aufmerksam gemacht, auch in der Praxis weitere Fälle auffindet. Aus den Versuchen am Kaninchen geht jedenfalls klar die außerordentliche Empfänglichkeit der Augenepithelien für das syphilitische Virus hervor, und es ist vielleicht möglich, daß auch das menschliche Auge primär mehr gefährdet ist, als man bisher angenommen hat.

Noch einige Worte über das Krankheitsbild bei den vom unverletzten Auge aus infizierten Kaninchen. 26 und 27 waren am 15. Mai in Versuch genommen und jetzt erst, Ende Dezember, sind die syphilitischen Erscheinungen völlig (ob endgültig?) zurückgegangen. Bei den anderen, am 11. August in Versuch genommenen Tieren (31, 32, 36, 37), nahmen die Erscheinungen Ende Dezember (nach periodischem Zurückgehen) im allgemeinen stark zu, bei 32, 36, 37 waren sie Anfang März des folgenden Jahres, also nach 8 Monaten noch vorhanden, z. T. verstärkt. Es liegt nahe, zu fragen, ob nicht auch bei der Kaninchen-Syphilis, ähnlich wie bei der Rekurrens, durch Variation der Menge der bei der Infektion in den Körper eingeführten Spirochaeten (die bei den obigen Versuchen sicher sehr gering ist), eine Variation des Krankheitsbildes erzielt werden kann, vor allem in dem Sinne, es dem bei der menschlichen Syphilis auftretenden ähnlicher zu machen. Die syphilitischen Hodenerscheinungen heilen jedenfalls in der Regel bedeutend schneller ab.

In diesem Zusammenhange möchte ich auf die Arbeit von Fritsche (1902) aufmerksam machen, der kutane Impfungen (allerdings auf die frisch rasierte und dabei in der Regel verletzte!) Bauchhaut bei Milzbrand, Diphtherie, Pest, Rotlauf, Schweineseuche, Geflügelcholera, Streptococcus pyogenes, Diplococcus lanceolatus, Staphylococcus pyogenes, Rotz, Tuberkulose vornahm und fand, daß der Krankheitsverlauf im allgemeinen länger als bei subkutanen Impfungen dauerte, bei Tuberkulose doppelt so lange.

Perkutane Infektionsversuche bei Kaninchen-Syphilis.

I. In unverletzten Falten der Skrotalhaut wird infektiöses spirochaetenhaltiges Hodenmaterial von Kaninchen durch ein Leukoplastpflaster festgehalten. (Mazerationen!)

Kan. 1.	19. 12. 1910.	In Falte der rechten Skrotalhaut wird ein Stückchen syph. Hodenmaterials mit einem Tropfen phys. Kochsalzlösung durch ein Pflaster festgehalten; links ebenso ohne phys. Kochsalzlösung. Das Pflaster wird nicht eher entfernt, bis es von selbst abfällt.
	3. 2. 1911.	Rechts zwei stecknadelkopf- bis erbsengroße, harte gelbliche Ödeme (entsprechend den von Uhlenhuth und Mulzer auf dem Skrotalsack durch Impfung erzeugten).
	Bis 6. 3. 1911.	Vergrößerung — dann Rückbildung.
	18. 3. 1911.	Massenhaft **Spirochaeten.**
		Die Erscheinungen wachsen periodisch und gehen zurück; z. B. am 5. 5. 4—5 kleine Ödeme derselben Art, 4. 8. alles verschwunden.
Kan. 2.	19. 12. 1910.	Derselbe Versuch wie in 1.
	3. 2. 1911.	Rechts unter Skrotalhaut ein kleines Ödem, das am
	21. 3. 1911	bis auf Bohnengröße gewachsen war — massenhaft **Spirochaeten.**

Kan. 3.	19. 12. 1910.	Rechter Skrotalsack vorher ein wenig mit Sandpapier gerieben, bis Rötung auftrat; dann wie bei 1. Linker Skrotalsack wie bei 1.
	Bis 4. 8. 1911.	Links nichts.
	14. 1. 1911.	Rechts Auftreten einer stecknadelkopfgroßen Rötung, die zurückging.
	18. 2. 1911.	Kleines syph. Ödem. Starke Entzündung und Induration an Penisspitze.
	24. 2. 1911.	Massenhaft **Spirochaeten.** Erscheinungen dauerten bis 5. 5. an. 4. 8. abgeheilt.
Kan. 4.	17. 2. 1911.	An linker Skrotalhaut derselbe Versuch wie bei 1, aber mit einem Tröpfchen phys. NaCl-Lösung. Pflaster nach einigen Tagen entfernt, wobei sich zeigte, daß das Epithel stellenweise durch eine leichte Mazeration zerstört war.
	Bis 5. 5. 1911.	Keine syph. Erscheinungen.
Kan. 5.	17. 2. 1911.	Wie 4., beiderseitig mit einem Tröpfchen phys. NaCl-Lösung.
	6. 4. 1911.	Ödeme auf beiden Skrotalsäcken (Schanker!) mit massenhaft Spirochaeten.
	Bis 15. 5. 1911.	Andauernd; dann exstirpiert.
Kan. 6.	17. 2. 1911.	Wie 4.
Kan. 7.	17. 2. 1911.	Wie 4.
Kan. 8.	24. 3. 1911.	Wie 4 — nur links.
Kan. 9.	24. 3. 1911.	Wie 4. — In Falte links ein syph. Hodenstückchen, rechts fein zerkleinerter Brei.

Negativ verlaufen.

Ia. Kein Pflaster.

Kan. 10.	24. 3. 1911.	Es wurde kein Pflaster verwandt. Ein Brei feingewiegter syph. Hodensubstanz mit vielen gut beweglichen Spirochaeten wurde auf eine Stelle der Skrotalhaut ohne Reiben aufgetragen.
	Bis 4. 8. 1911.	Negativ.
Kan. 11.	24. 3. 1911.	Wie 10.
	Am 20. 4. 1911.	Kleines hartes Ödem etwa stecknadelkopf-groß.
	Bis 12. 5. 1911.	Wechselnd groß, aber nicht viel gewachsen. Punktiert, aber keine Spirochaeten gefunden. — Kleinheit des Ödems erschwerte Untersuchung sehr. Nach der Punktion zurückgegangen. Bis Juli nichts.
Kan. 12.	24. 3. 1911.	Wie 10. Bis 6. 4. nichts. 11. 4. gestorben.
Kan. 13.	24. 3. 1911.	Wie 10. Bis 2. 4. nichts. 5. 4. gestorben.

II. Versuche zur perkutanen Infektion am Epithel des Penis.

Kan. 14.	19. 12. 1911.	Kleines Stückchen syph. Hodenmaterials von Kaninchen in den Präputialsack vorsichtig eingeschoben. 6. 3. bis Anfang April: Starke Entzündung des Penis — keine Induration. Kein Spirochaetenbefund. Tier starb Anfang April.
Kan. 15.	20. 4. 1911.	Einige Tröpfchen punktierten Serums mit Spirochaeten (aus Ödemen von Kaninchen 5) unter die Eichel aufgeträufelt.
	Bis 4. 8. 1911.	Negativ.
Kan. 16.	20. 4. 1911.	Wie 15.
Kan. 17.	20. 4. 1911.	Wie 15.
Kan. 18.	20. 4. 1911.	Wie 15.
Kan. 19.	15. 5. 1911.	Aus feinzerhacktem und mit phys. NaCl-Lösung etwas verdünntem Material Flüssigkeit mit Kapillare abgesogen und in den Präputialsack eingeträufelt.
Kan. 20.	15. 5. 1911.	Wie 19.
Kan. 21.	15. 5. 1911.	Wie 19.

Bis auf unverdächtige weiche Entzündungen nichts. Bis August 1911 beobachtet.

III. Perkutane Infektionsversuche mit Kaninchensyphilis an den Epithelien des Auges.

Kan. 22. 11. 8. 1911. Syph. Hodengeschwür von Kaninchen wurde mit einem Skalpell auf Holzunterlage zu einem sehr feinen Brei zerhackt und mit phys. NaCl-Lösung ein wenig verdünnt. Einige Tropfen Flüssigkeit wurden mit Kapillare abgesogen und in das unverletzte normale Auge geträufelt. Beide Augen!

11. 9. 1911. Auf rechtem Bulbus an Insertionsstelle des Musculus recti superior direkt auf der Kornealfalz einige sandkorngroße Bläschen.

16—25. 9. 1911. Ebenso. Auf der Nickhaut ebenfalls ein etwas größeres Bläschen. Auch auf dem linken Auge ein Bläschen (?).

1. 10. 1911. Auf dem rechten Auge und Nickhaut ebenso, etwas vergrößert. Links nichts.

17. 10. 1911. In den sandkorngroßen Bläschen auf rechtem Auge und Nickhaut wurden Spirochaeten nicht gefunden.

27. 10. 1911. Erscheinungen ganz zurückgegangen.

3. 11. 1911. Bläschen auf rechtem Auge tritt wieder auf.

11. 12. 1911. Bläschen auf rechtem Auge wird größer.

4. 3. 1912. Die Bläschen sind noch vorhanden, Spirochaetennachweis negativ.

Kan. 23. 11. 8. 1911. Wie 20.

Bis 21. 9. 1911. Nichts.

25. 9. 1911. Gestorben.

Kan. 24. 11. 8. 1911. Wie 20.

Bis 16. 9. 1911. Nichts.

21. 9. 1911. Gestorben.

Kan. 25. 11. 8. 1911. Wie 20.

11. 9. 1911. Nichts.

16. 9. 1911. Rechts auf Bulbus an derselben Stelle wie 21 eine kleine Erhöhung mit starkem Netz von Gefäßen darunter.

21. 9. 1911. Etwas zurückgegangen.

25. 9. 1911. Wieder vorhanden — stecknadelkopfgroß! links nichts.

29. 9. bis 1. 10. 1911. Auf beiden Augen nichts.

16. 10. 1911. Gestorben.

In den folgenden Versuchen wurde der feinzerhackte Brei selbst (nicht nur die mit Kapillaren abgesogene Flüssigkeit wie bei den vorhergehenden Versuchen) in die Augen hineingebracht, indem das untere Lid ein wenig vom Bulbus abgezogen wurde. Druck und stärkeres Reißen oder Reiben ist völlig vermieden worden. Die geringe Menge des Breies war nach einigen Minuten schon wieder aus dem Auge herausgetreten und wurde bald darauf mit einem Wattebausch entfernt. (Abwischen mit Wattebausch ist nicht geschehen bei 26 u. 27.)

Kan. 26. 15. 5. 1911.

17. 5. 1911. Völlig normales Aussehen des Auges, Entzündungen oder Mazerationsprozesse nicht zu sehen.

Bis 6. 6. 1911. Nichts.

4. 8. 1911. Auf der Nickhaut des linken Auges ein kleines nicht ganz linsengroßes Ödem mit viel **Spirochaeten.**

12. 9. 1911. Auf der Mitte des unteren Lidrandes des linken Auges ein typisch syph. erbsengroßes Ödem. Ödem auf der Nickhaut stark vergrößert.

Bis 14. 10. 1911. Andauerndes Wachstum beider Effloreszenzen. Ödem auf Lid bohnengroß. — Schanker.

11. 12. 1911. Gänzlich zurückgegangen.

Kan. 27. 15. 5. 1911. Wie 26. Material von demselben syph. Hoden wie bei 18—20, 25.

17. 5. 1911. Völlig normales Aussehen des Auges.

Bis 6. 6. 1911. Nichts zu sehen.

4. 8. 1911. Am rechten Auge auf dem Bulbus auf derselben Stelle wie bei 24 und 21 ein nicht scharf umschriebenes unregelmäßig erhöhtes Ödem (nicht auf der Kornealfalz, sondern etwas darüber, aber bis an sie heran-

reichend). Auf dem oberen Lid genau über diesem Ödem ein zweites (bereits offen!) etwas mehr als stecknadelkopfgroß — (Taf. 1, Fig. 3.) — In beiden Erscheinungen massenhaft **Spirochaeten.**

21. 9. 1911. Fast ganz zurückgegangen.
1. 10. 1911. Schanker auf Lid ganz abgeheilt. Ödem auf Bulbus wieder zugenommen.
19. 10. 1911. Ödem auf Bulbus noch sehr stark.
11. 12. 1911. Fast abgeheilt.

Bei den Versuchen 27—37 dasselbe Material benutzt. Die Kaninchen wurden auch in den ersten Tagen nach der Impfung kontrolliert, ob Entzündungen oder Mazerationen aufgetreten waren. Das war bei keinem Versuch der Fall.

Kan. 28. 11. 8. 1911. Wie 26, nur linkes Auge. Das rechte zeigte eine allgemeine Entzündung und Rötung.
Bis 21. 12. 1911. Nichts, außer einer starken Rötung des linken Auges am 25. 9.

Kan. 29. 11. 8. 1911. Wie 26.
11. 9. 1911. Nichts.
16. 9. 1911. Am rechten Auge an Insertionsstelle des M. recti sup. auf Kornealfalz kleines Bläschen.
21. 9. 1911. Zurückgegangen.
Bis 11. 12. 1911. Nichts.

Kan. 30. 11. 8. 1911. Wie 26.
Bis 11. 9. 1911. Nichts. Am 16. 9. eingegangen.

Kan. 31. 11. 8. 1911. Wie 26.
11. 9. 1911. Geringe Rötung des Auges.
Bis 1. 10. 1911. Nichts.
6. 10. 1911. Am rechten Auge Insertionsstelle des Musc. recti inf. geschwollen und gerötet.
14. 10. 1911. Ebenso — außerdem von der Schwellung ausgehende starke milchige Trübung der Kornea.
21. 10. 1911. Völlige Trübung der Kornea.
27. 10. 1911. **Spirochaeten** in der Kornea des rechten Auges.
21. 11. 1911. Trübung der Kornea in beiden Augen.
19. 12. 1911. **Spirochaeten** in der Kornea des linken Auges.

Kan. 32. 11. 8. 1911. Wie 26.
11. 9. 1911. Nichts Auffälliges außer einer Rötung beider oberen Lider(?).
16. 9. 1911. Bläschen mit starkem Gefäßnetz an Insertionsstelle des M. recti sup. auf Kornealfalz am linken Auge.
21. 9. 1911. Nichts.
25. 9. 1911. Wie am 16. 9.
29. 9. 1911. Nichts.
1. 10. 1911. Bläschen nicht deutlich — allgemeine Entzündung und Rötung der betreffenden Stelle.
14. 10. 1911. Ebenso — starke milchige Trübung der gesamten Kornea.
21. 10. 1911. Auch am rechten Auge an derselben Stelle wie am linken rötliche Schwellung und starke Kornea-Trübung.
27. 10. 1911. **Spirochaeten** in der Kornea in beiden Augen.
11. 12. 1911. Ödem am linken oberen Augenlid.
4. 3. 1912. Alle Erscheinungen, z. T. verstärkt, noch vorhanden!

Kan. 33. 11. 8. 1911. Wie 26.
Bis 11. 9. 1911. Nichts.
Vom 16. 9. bis 1. 10. 1911 ist auf beiden Augen die Kornealfalz oben länglich verdickt und erhöht, Gefäßnetz darunter etwas verstärkt. Scheinbar nicht syphilitisch.
21. 12. 1911. Nichts.

Kan. 34. 11. 8. 1911. Wie 26.
Bis 21. 10. 1911. Nichts Auffälliges.
25. 10. 1911. Eingegangen.

Kan. 35.	11. 8. 1911.	Wie 26.
	11. 9. 1911.	Am linken Auge oben am äußersten Rande der Insertionsstelle des Musc. recti superior etwas über der Kornealfalz zwei kleine Bläschen.
	16. 9. 1911.	An derselben Stelle ein typisches Ödem von mehr als Stecknadelkopf-Größe.
	Bis 1. 10. 1911.	Langsames Wachstum bis aufs Doppelte bis 6. 10.
	14. 10. 1911.	Etwas zurückgegangen. Spirochaeten-Nachweis mißlungen.
	27. 10. 1911.	Bläschen auf linkem Auge oben nur noch sehr winzig. Am rechten Auge an der Kornealfalz oben und unten eine rötliche Schwellung, unten sehr stark.
	3. 11. 1911.	Am rechten Auge in der Mitte leichte **Trübung** der Kornea.
	8. 11. 1911.	Zurückgegangen.
	20. 11. 1911.	Am rechten Auge oben an der Kornealfalz sehr kleines nicht deutliches Bläschen — am linken Auge oben ebendort deutliches Bläschen.
	11. 12. 1911.	An denselben Stellen des rechten und linken Auges sehr deutliche Schwellungen!!
	4. 3. 1912.	Alle Erscheinungen zurückgegangen bis auf eine leichte Schwellung am linken Auge oben.
Kan. 36.	11. 8. 1911.	Wie 26.
	11. 9. 1911.	Normal außer einer nicht diagnostizierbaren kleinen Schwellung am oberen Lid des linken Auges.
	Bis 25. 9. 1911.	Nichts.
	29. 9. 1911.	Auf der Insertionsstelle des Musc. recti inferior eine diffuse stark gerötete Entzündung.
	14. 10. 1911.	Starke an die Rötung sich anschließende milchige Trübung des unteren Teiles der Kornea.
	21. 10. 1911.	Starke Vortreibung des unteren Teiles des Bulbus.
	27. 10. 1911.	Trübung der Kornea und Vortreibung des Bulbus ganz zurückgegangen.
	3. 11. 1911.	Wieder wie am 21. 10. **Massenhaft Spirochaeten** in der Kornea des rechten Auges.
	19. 12. 1911.	Auf beiden Augen starke Trübung der Kornea. An beiden unteren Augenlidern erbsengroßer Schanker. **Spirochaeten** auch in der Kornea des linken Auges, ferner in den Schankern an beiden Augenlidern.
	4. 3. 1912.	Erscheinungen fast ganz zurückgegangen.
Kan. 37.	11. 8. 1911.	Wie 26.
	11. 9. 1911.	Nichts.
	29. 9. 1911.	Am rechten Auge unten an den äußersten Ausläufern der Insertionsstelle des Musc. recti inferior dicht unter der Kornealfalz eine typische Schwellung von etwa der doppelten Größe eines Stecknadelkopfes.
	1. 10. 1911.	Etwas zurückgegangen.
	14. 10. 1911.	Ebenso. Ganz schwache Trübung der Kornea unten.
	27. 10. 1911.	Zurückgegangen — keine Trübung.
	3. 11. 1911.	Starke Trübung. — **Massenhaft Spirochaeten.**
	11. 12. 1911.	Sehr starke Trübung!
	4. 3. 1912.	Erscheinungen noch sehr stark vorhanden.
Kan. 38.	11. 8. 1911.	Wie 26.
	Bis 21. 9. 1911.	Nichts. Am 25. 9. eingegangen.

II. Über die Eingangspforten der Spirochaeten bei den „perkutanen" Infektionen.

1. Literatur über Infektionen durch Epithelien überhaupt.

Eine kurze Darstellung der Infektionsmöglichkeiten durch anscheinend normale Epithelien hindurch, sei, soweit sich Angaben darüber in der bakteriologischen Literatur finden, vorangestellt.

Im allgemeinen gilt die äußere Körperhaut infolge ihrer Verhornung und der schweren Benetzbarkeit als ein ziemlich sicherer Schutzwall gegen das Eindringen von Krankheitserregern, während man annimmt, daß die Schleimhäute leichter als Eingangspforten dienen können. Es muß bei sämtlichen Infektionskrankheiten (außer natürlich bei manchen Wurmkrankheiten, überhaupt solchen, bei denen ein Wachstum der Erreger durchaus auf das Lumen offener Körperhöhlen beschränkt ist) dieser Schutzwall stets in irgend einer Weise angegriffen oder durchbrochen werden, damit die Infektion zum Ausbruch kommt. Wo das nicht durch grobe Verletzungen oder den Stich von Überträgern geschieht, sind Möglichkeiten vorhanden, die sich in folgender Weise kurz und, wie mir scheint, erschöpfend darstellen lassen:

1. Eindringen durch vollkommen unversehrtes Epithel mittels Bewegung.

Nur wenig sichere Fälle. Gewissermaßen klassisch für den Begriff der perkutanen Infektion überhaupt sind die Looßschen Versuche mit Ancylostoma duodenale, A. caninum und Strongyloïdes stercoralis, die durch mehrfache Nachprüfungen (Liefmann, Schaudinn u. a.) zur Genüge bestätigt sind. Als Eintrittspforten kommen im wesentlichen die unversehrten Haarbälge, aber auch, wie Looß angibt, Desquamationen des Stratum corneum in Betracht, soweit sie dem bohrenden und schlängelnden Wurm Widerhalt für den Körper gewähren können.

Unter dieselbe Rubrik fallen auch die meisten Infektionen der Überträger von Protozoenkrankheiten:

Rückfallfieber-Spirochaeten durchdringen die Darmepithelien von Zecken, Malariaparasiten die von Mücken, Hämogregarinen die von Egeln; überhaupt ist die unverletzte Darmschleimhaut die Eintrittspforte für alle die Infektionen mit Gregarinen und Coccidien, die sich in irgendwelchen anderen Geweben als dem Darmepithel selbst ansiedeln. Allerdings ist in den wenigsten Fällen mit Sicherheit entschieden, ob nicht neben der Bewegungstätigkeit noch ein anderer Umstand eine Wirkung ausübt, der (siehe unter 2) wesentlich für das Zustandekommen einer großen Zahl von Bakterienkrankheiten in Betracht kommt: die Ausscheidung von Toxinen zur Zerstörung der Epithelien. Unter Protozoen-Krankheiten ist das nur für die Sichelkeime der Sarcosporidien (Teichmann, Erdmann) erwiesen.

2. Eindringen in unversehrte Epithelien durch Wachstum oder Ausscheidung von Toxinen, die die Epithelien angreifen.

Die wichtigste Infektionsart bei bakteriellen Erkrankungen; freilich ist auch hier die Schädigung der Epithelien durch Toxine meist mehr vermutet als experimentell nachgewiesen. Zahlreiche Infektionsversuche an der unverletzten Körperhaut sind mit Staphylokokken gemacht worden (Garré 1885, Schimmelbusch 1888, Unna 1896, Pérez 1897, Simoncini 1903). Die Applikation erfolgte in allen Fällen durch Einreiben der intakten Haut — die Infektionen erfolgten dann von den Haarbälgen aus, wie außer anderen z. B. Unna mikroskopisch nachgewiesen hat. Das Durchdringen durch die Epithelien stellt man sich dann so vor, daß durch die Vermehrung der Bakterien eine Schädigung des Epithels und dann ein Durchwachsen

durch die geschädigten Zellen hindurch stattfindet. Man darf wohl annehmen, daß in diesen Fällen das Epithel der Haarbälge vorher unversehrt war, daß aber zum Zustandekommen der Infektion die Bakterien in die Haarbälge eingerieben werden müssen. Ähnliche Versuche sind bei Milzbrand gemacht worden (Roth 1888). Es wurden kontinuierliche Infektionen von den intakten Haarbälgen aus mikroskopisch nachgewiesen, aber ausdrücklich betont, daß die Infektion nur bei festem Einreiben erfolgt, während gegen einfaches Berühren oder Bestreichen die Haut sicheren Schutz bot. Auch bei Rotz wird behauptet (Cornil 1890), daß Einreiben der Haut in vielen Fällen positive Infektionen ergibt (viele Fälle versagen aber auch), und daß die Haarbälge als Eintrittspforten in Betracht kommen. Sichere mikroskopische Beobachtungen liegen nicht vor. Wichtig sind sodann die vielfachen Versuche bei Tuberkulose [Babes (1907), Perez (1907), Simoncini (1903), Fränkel (1910), Königsfeld (1911)]. Besonders die beiden letzteren haben alle Vorsichtsmaßregeln berücksichtigt, um Wunden auf der Haut der Meerschweinchen oder Infektionen durch Inhalation usw. mit den aufgetragenen Bakterien zu vermeiden (Rasieren oder Epilieren der Haut 2—3 Tage vor Versuch, Auftragen der Bakterien unter Verband mit einer Salbe). Die Infektion erfolgt in äußerst zahlreichen Fällen. Auch Einreiben in die gänzlich unverletzte und unrasierte Haut führt zu positiven Ergebnissen (Babes wies mikroskopisch bei letzteren Versuchen Infektion der Haarbälge nach und meint, daß die Bakterien durch Einreiben in die Haarbälge eingebracht werden). Königsfeld, dessen Versuche am einwandfreiesten sind, zeigte, daß die Bakterien bereits nach $7^1/_2$ Stunden das Unterhautbindegewebe erreicht haben (Abbildungen, die das kontinuierliche Durchdringen durch das Epithel erkennen lassen). Über das eigentliche Vektionsmittel der unbeweglichen Stäbchen durch das sicher unverletzte Epithel hindurch ist keine volle Klarheit zu gewinnen. Babes (1907) scheint ein Wachstum schon in den Haarpapillen anzunehmen; Königsfeld (1911) äußert sich nicht näher darüber. Denkbar wäre auch, daß die angewandte Salbe vielleicht bis zu den Interzellularräumen durchdringt und entweder Wachstum oder Strömungen in den Interzellularen die Bakterien weiter treiben. Der über der Salbe angebrachte feste Verband könnte infolge der Bewegungen des Tieres ein Einreiben bewirken, aber die Versuche gelingen auch ohne Verband, nur mit der Salbe. Sehr bemerkenswert ist die allerdings nicht voll bewiesene Ansicht Königsfelds, daß nur dann, wenn die Haut verletzt war, eine Hauttuberkulose, bei völlig unversehrter Haut aber eine regionäre Drüsentuberkulose auftrete.

Lepra-Bazillen sind von Babes (1883) in den Haarpapillen mikroskopisch nachgewiesen worden; er spricht daher die letzteren als Eingangspforten der Infektion an. Von anderer Seite wird die Nasenschleimhaut (auf der Primäraffekte nachgewiesen wurden) als solche angesehen. Eine Entscheidung der Frage ist wohl noch nicht erfolgt.

Auch viele Infektionen durch die Schleimhäute hindurch werden unter die Gruppe 2 fallen: man ist hier aber mannigfachen, äußerst schwer übersehbaren Fehlerquellen ausgeliefert. Z. B. weiß man in den meisten Verfütterungsfällen naturgemäß nichts darüber, ob die in Betracht kommenden Epithelien tatsächlich unversehrt waren. Allerdings wird man z. B. bei den gelungenen Fütterungsversuchen mit

Cholera und Typhus nicht als unabweisbare Vorbedingung des Gelingens eine Schädigung der Darmschleimhaut voraussetzen wollen, sondern nimmt an, daß erst durch das Wachstum der Bakterien und irgendwelche Produkte derselben die Schädigung und das Einwandern erfolgt. Dieselbe Annahme macht man bei Gonokokken, die im wesentlichen überhaupt auf der Oberfläche der Schleimhaut wachsen und erst sekundär eindringen sollen. Die Sachlage entscheidende mikroskopische Untersuchungen darüber, wie die Infektion mit Tuberkulose z. B. bei Inhalation erfolgt, konnte ich nicht auffinden.

Auffallend viele positive Infektionsversuche sind an der unverletzten Augenbindehaut vorgenommen worden. Eine schwer auszuscheidende Fehlerquelle besteht auch hier, soweit sich nicht, wie z. B. bei den obigen Syphilis-Versuchen, durch lokalisierte Primäraffekte die Stelle der Infektion festlegen läßt: die Erreger können in allen Fällen auch die Nasenschleimhaut und von da aus Mund- und Darmschleimhäute gewinnen, so daß zu vermuten ist, daß die große Zahl gelungener Infektionen eben auf diese günstigen Verhältnisse zurückzuführen ist. Ich verweise auf die umfangreiche Zusammenstellung hierher gehöriger Versuche (bei Rotz, Milzbrand, Mäuseseptikämie, Ribbertscher Darmdiphtherie der Kaninchen, Hühnercholera usw.) in Kolle und Hetsch (Die exp. Bakt. und die Infekt.-Krankh.) und Kolle und Wassermann (Handb. d. path. Mikroorg. Bd. 1).

Die sicher ungeschädigte Bindehaut von Ratten ist, wie besonders hervorgehoben sei, äußerst empfindlich für Pestbazillen (Bericht der deutschen Pestkommission 1899, Kolle 1901, Kossel und Overbeck 1902). Allerdings ist auch hier nicht erwiesen, ob tatsächlich die Epithelien des Auges selbst die Eingangspforte liefern.

Auch in der Arbeit von Fritsche (1902) findet sich eine gute Literatur-Zusammenstellung. Die eigenen Versuche des Autors bei einer großen Zahl bakterieller Erkrankungen wurden an der frisch rasierten, meist verletzten Haut vorgenommen; es handelt sich also nicht um eigentliche perkutane Infektionen. Wichtig sind aber die mikroskopischen Untersuchungen, die doch in vielen Fällen Haarbälge als Eingangspforten feststellten.

3. Eindringen von Erregern durch Defekte an Epithelien, die, weil überall vorkommend, gewissermaßen als normal anzusehen sind.

Es handelt sich um geringfügige Läsionen, wie sie z. B. das Abstoßen des Stratum corneum am Rete Malpighii lokal hervorrufen kann — sie brauchen vielleicht nur so weit zu gehen, daß Interzellularen freigelegt sind, ohne daß irgend eine Zelle verletzt ist. Über diese Infektionsmöglichkeit finden sich keine oder wenig beweisende Angaben in der bakteriologischen Literatur. Zu verweisen ist höchstens auf die Looßsche Angabe, daß Ancylostoma auch durch Desquamationen der Haut einzudringen vermöge, und auf die These Königsfelds, daß bei perkutanen Infektionsversuchen mit Tuberkulose an Läsionen Hauttuberkulose, sonst Drüsentuberkulose auftrete.

2. Eingangspforten der Spirochaeten bei obigen Versuchen.

Die oben angeführten Versuche zur perkutanen Infektion mit Spirochaeten sind anfangs hauptsächlich in der Absicht ausgeführt worden, die Eingangspforten der Infektion aufzufinden. Es ist ziemlich klar, daß unter den eben angeführten drei Möglichkeiten eigentlich nur die erste und dritte in Betracht kommen, da ja die Rekurrens- und Hühnerspirochaeten sich nur im kreisenden Blute vermehren.

Daß die Spirochaeten nicht durch die Haarbälge hindurchdringen, läßt sich aus folgenden Punkten schließen:

1. Die sichersten Ergebnisse mußte die mikroskopische Untersuchung liefern. Es wurden zu dem Zwecke die herausgeschnittenen Hautstücke der Ratten nach Levaditi versilbert und auf Schnitten untersucht. In sehr zahlreichen Fällen wurde ein großes Stück Haut längere Zeit der Einwirkung infektiösen Blutes ausgesetzt und dann auf einzelnen Schnitten, nicht Schnittserien durch das ganze Hautstück, untersucht, da es fast nie gelingt, bei großen Hautstücken, auch wenn die Haare nach dem Rasieren kaum gewachsen sind, vollständige Schnittserien zu erhalten; bei kleinen nicht zu lange versilberten gelingt das öfter. Später wurden nur kleine, etwa erbsengroße Hautstücke mit Blut bestrichen und aus der Ratte herausgeschnitten. In keinem der mit großem Zeitaufwand untersuchten Schnitte konnte eine Infektion der Haarbälge festgestellt werden. In einer Anzahl von Fällen wurden ganz junge Ratten, bei denen die Haare gerade hervorsproßten, benutzt — ebenfalls ohne daß in den Haarpapillen und ihrer Umgebung Spirochaeten auffindbar waren. Es ist also ganz sicher, daß die Haarbälge nicht etwa in der Weise als Eingangspforten in Betracht kommen, wie Looß das für Ancylostoma nachgewiesen hat, d. h. daß fast jeder normale Haarbalg die Spirochaeten aufnehmen kann. Wenn aber doch einzelne Haarbälge, die vielleicht irgendwie verändert oder geschädigt waren, die Eingangspforten gewesen sein sollten, so hätten sie bei der angewandten Versuchstechnik schließlich doch einmal auffallen müssen.

Denn um möglichst massenhaft Spirochaeten in den Eintrittspforten zu haben, wurden die Hautstücke lange Zeit und immer von neuem mit stark infiziertem Spirochaetenblut bestrichen; da die ersten Spirochaeten schon nach ungefähr 3 Minuten (siehe Seite 83) eindringen, mußten nach etwa einer Stunde schon große Mengen eingedrungen sein, die dem Auge kaum noch entgehen können. Daß tatsächlich riesige Mengen eindringen, falls die Gelegenheit gegeben ist, beweisen Schnitte durch leichte künstliche Verletzungen.

2. Bei Hühnern wurden perkutane Infektionsversuche mit Hühnerspirochaeten an der mit Federn bedeckten Brusthaut und an den nackten Hautlappen unter dem Schnabel und am Kamm gemacht (Tab. VIII und IX).

Im ersteren Fall waren von 13 Versuchen 7 positiv, im letzteren von 15 Versuchen 5 positiv: daraus folgt, daß das Vorhandensein von Federpapillen für das Eindringen von Spirochaeten durch die Haut nicht notwendig ist. Bei Ratten konnten analoge Versuche nicht so leicht ausgeführt werden. In Betracht kommen höchstens die Versuche am Penis (Tab. VI, VII), die ergeben, daß

eine perkutane Infektion durch das Epithel der Penisspitze nicht gelingt. Einerseits ist aber die Zahl der Versuche zu gering, andererseits glaube ich, daß wesentlich für das Mißlingen neben der geringen Größe der bestrichenen Fläche die vor Verletzungen gut geschützte Lage des Penis ist (Seite 86). Vielleicht hat auch Manteufel recht, der bei seinen Trypanosomen-Versuchen die Vermutung ausspricht, daß irgend welche Sekrete vorbeugend wirken. Die positiven Fütterungsversuche, überhaupt alle Infektionen durch die Schleimhäute hindurch sind aus dem Grunde kaum verwertbar, weil die in Betracht kommende Fläche zu groß und zu wenig kontrollierbar ist. Mikroskopische Untersuchungen (von Vagina- und Mund- und Nasen-Epithelien) hatten kein Ergebnis.

So wenig wie die Haarbälge kommen aber auch alle anderen gleichmäßig über die ganze Epithelfläche verbreiteten Elemente der Haut in Betracht, weder die Drüsen noch der normale Zellbelag. Das ergibt sich aus verschiedenen Punkten.

1. Es ist schon darauf hingewiesen, wie außerordentlich wenig gleichmäßig die Versuche überhaupt gelingen — bei gleicher Größe der bestrichenen Fläche. Je geringer aber die bestrichene Fläche ist, desto seltener gelingt die Infektion: von ungefähr 50 Versuchen, in denen die bestrichene Fläche nicht größer als eine Linse war, gelangen nur 2! Dagegen erzielt man fast in allen Fällen ein positives Ergebnnis, wenn man den größten Teil der Bauchfläche bestreicht. Für das Mißlingen im ersteren Fall kann weder die geringe Benetzbarkeit der Haut durch kleine Bluttropfen (Abwaschen der Haut mit Äther) noch verminderte Virulenz der Spirochaeten (es wurde zuletzt nur noch ein Ratten tötender Stamm verwandt) verantwortlich gemacht werden. Es bleibt nur der eine Schluß möglich, daß bestimmte, nicht überall vorhandene Besonderheiten der Haut die Eingangspforten bilden — d. h. Defekte der Haut.

2. In gewisser Weise deutet darauf auch das außerordentlich schnelle Eindringen der Spirochaeten hin; nach Tabelle II sind sie bereits nach 3 Minuten so weit in die Haut eingedrungen, daß kräftiges Abwaschen mit absolutem Alkohol sie nicht mehr abtötet. Ferner beweist die lange Inkubationsdauer bei den Infektionen mit Hühner- und Rekurrens-Spirochaeten, daß im allgemeinen nicht viel mehr Spirochaeten eindringen, als etwa beim Biß der Überträger [Zusammenhang zwischen Menge der inokulierten Spirochaeten und Inkubationszeit ist durch Manteufel und eigene Versuche erwiesen; man vergleiche auch die Übertragungen von Rekurrens- und Hühnerspirochaeten durch den Stich von Stomoxys calcitrans (Schuberg und Kuhn 1911)]. Es müßten aber mehr Spirochaeten eindringen, wenn bei der oft mehr als stundenlangen Einwirkung des Blutes zahlreiche, überall verteilte Eingangspforten vorhanden wären.

3. Die mikroskopische Untersuchung führte zu demselben Ergebnis. Zunächst seien die zahlreichen vergeblichen Versuche angeführt, in Schnitten der Haut von Ratten Spirochaeten zu finden (große Flächen bestrichen — die meisten Tiere vor dem Herausschneiden der Haut getötet, nur wenige am Leben erhalten, um die erfolgte Infektion nachzuweisen). Es wurde besonders auf leichte Desquamationen des Stratum corneum geachtet, aber niemals eine tiefer eingedrungene Spirochaete gefunden, auch in einigen Fällen nicht, in denen die Rattenhaut kurz vor dem Versuch

mit Seife und Wasser gewaschen war. Auch in der Haut ganz junger, erst einige Tage alter Ratten, die nach der oben erwähnten Annahme von Nattan-Larrier doch leichter durchlässig sein müßte, wurden Spirochaeten nicht gefunden. Diese negativen Ergebnisse beweisen schon ganz einwandfrei, daß nur besondere ganz vereinzelte Stellen als Eingangspforten in Betracht kommen. Um über ihre Beschaffenheit etwas zu erfahren, wurden nur kleine, bis erbsengroße Hautstellen mit infektiösem Blut bestrichen, aus der lebenden Ratte herausgeschnitten und auf lückenlosen Serienschnitten untersucht. In dem einzigen unter 28 Fällen, in dem die überlebende Ratte tatsächlich infiziert war (Tabelle V, 5), gelang es mir auch, die Eingangspforte zu finden: durch eine allerdings nur mikroskopisch sichtbare, nicht blutende Unterbrechung der Kontinuität des Rete Malpighii (die Zellen waren bis zum Unterhautbindegewebe auseinandergerissen und ein wenig übereinander geschoben) drang ein ununterbrochener Strom von Spirochaeten ein (Taf. I, Fig. 1), der sich im Bindegewebe verteilte. In den umliegenden Gefäßen waren keine Spirochaeten zu finden, wohl aber in größeren in der Nähe liegenden Lymphspalten (Taf. I, Fig. 2). Bemerkenswert ist, daß nach Looß auch die Ancylostomen zunächst in die Lymphspalten eindringen. Vielleicht ist auch der Umstand, daß erst der Lymphstrom die Spirochaeten ins Blut bringen muß, dafür verantwortlich zu machen, daß die Verimpfung des Blutes perkutan infizierter Ratten erst nach längerer Zeit positiv ist (Versuche von Nattan-Larrier; Tab. IV). Es ist kein Grund vorhanden, gerade diesen einen Versuch, in dem der Nachweis der Eingangspforte erfolgen konnte, nicht für typisch zu halten, wenn man auch die Möglichkeit zugeben muß, daß vielleicht noch geringfügigere Läsionen eine Infektion ermöglichen. Es sind aber, um überhaupt eine Vorstellung darüber zu gewinnen, wieweit die Spirochaeten das Hindernis der Epithelzellen überwinden können, eine Anzahl Versuche gemacht, auf durch Reiben mit Sandpapier leicht beschädigtes Epithel spirochaetenhaltiges Blut aufzuträufeln, und die Haut auf versilberten Schnitten zu untersuchen. Es ergab sich dabei, daß tatsächlich im allgemeinen die Spirochaeten nur dann in das Bindegewebe eingedrungen waren, wenn die Kontinuität des Rete Malpighii zerstört war. Nur sehr selten waren von außen Spirochaeten in das Plasma noch festsitzender, etwas zerflossener Zellen eingedrungen, häufiger von innen solche Spirochaeten, die bereits durch einen größeren Defekt das Bindegewebe erreicht hatten. Dieser Befund macht mir die Vermutung, daß die Spirochaeten vielleicht doch auch schon durch die Interzellularen noch gar nicht verletzter, nur oberflächlich freigelegter Zellen eindringen könnten, wenig wahrscheinlich, widerlegt sie aber natürlich nicht.

Im ganzen aber darf man den Schluß wohl ziehen, daß die sog. „perkutanen" Infektionen bei Rückfallfieber und Hühnerspirochaetose durch Defekte der Haut erfolgen, die immerhin so stark sind, daß sie nicht stets und überall, sondern erst in einer bestimmten Zahl von Fällen auf einer größeren Hautfläche zu finden sind.

Ob dieser Schluß ohne weiteres auf die doch immerhin bedeutend größeren Trypanosomen (bei denen Uhlenhuth, Hübner und Woithe, Manteufel u. a.

ebenfalls perkutane Infektionen gelangen) übertragbar ist, sei dahingestellt. Ebenso möchte ich mich inbezug auf die oben erwähnten Syphilis-Infektionen beim Kaninchen nicht näher aussprechen, da mikroskopische Untersuchungen fehlen, wenn ich auch gerade hier im Einklang mit den üblichen Anschauungen der Dermatologen eine mikroskopische Verletzung annehmen möchte, die gerade am Auge durch kleine, von den Lidern hin- und herbewegte Fremdkörper wohl leicht entstehen können; an anderen Epithelien des Kaninchens sind ja die Versuche auch nicht gelungen. Von 17 Kaninchen, deren beide Augen in Versuch genommen wurden, sind bis jetzt 6 Tiere (9 Augen) infiziert, immerhin eine nicht geringe Zahl. Auffällig ist die außerordentlich lange Inkubationszeit in den meisten Fällen. Es würde nicht uninteressant sein, zu erfahren, wie lange sich die Spirochaeten im Konjunktivalsack beweglich und lebensfähig erhalten, ohne in das Gewebe einzudringen — vielleicht vermögen sie eine Verletzung längere Zeit abzuwarten, was dann das Gelingen der Versuche noch weniger auffällig machen würde.

Zahlreiche Infektionsversuche sind bei Trypanosomen und Spirochaeten per os gemacht worden [Rabinowitsch und Kempner (1899), Francis (1903), Laveran und Mesnil (1904), Yakimoff u. Schiller (1907), Uhlenhuth, Hübner u. Woithe (1908), Manteufel (1909), Nattan-Larrier (1909), Mesnil (1909), Gozóny (1911)]. Eine sichere Entscheidung, ob hier ebenfalls Verletzungen der Darmschleimhaut Vorbedingung sind, ist, wie oben bereits ausgeführt, sehr schwer zu führen. Laveran u. Mesnil (1904) stehen auf dem Standpunkt, daß Verletzungen nötig sind. Dafür spricht das durchaus unregelmäßige Gelingen der Versuche bei derselben Trypanosomenart; ungeklärt aber ist, warum diese Versuche nicht bei allen Trypanosomenarten gelingen (z. B. nicht bei Nagana; Manteufel 1909 in 8 Fällen). Eine mikroskopische Untersuchung ist wünschenswert.

Von großem Interesse sind schließlich noch die kürzlich veröffentlichten Versuche von Nattan-Larrier (1911) über die Vererbbarkeit der Rekurrens bei Ratten und über den Weg der Spirochaeten dabei. Er steht auf dem Standpunkt, daß das Plazentargewebe durchaus nicht verletzt zu sein brauche, um den Spirochaeten die Durchwanderung zu gestatten. Seine schönen Abbildungen zeigen auch in der Tat, daß die Spirochaeten in der Plazenta in allen möglichen Gewebselementen, sogar im Plasma von Zellen und in der einfachen Zelllage der Plazentargefäße vorkommen. Trotzdem ist damit noch nicht erwiesen, daß die Überschwemmung des Gewebes nicht von Gefäßrupturen ihren Ausgang nimmt, die z. B. in der menschlichen Plazenta auch nach Nattan-Larrier selbst (S. 744) neben Nekrosen und Leukozytenwanderungen häufig sind. In 40 untersuchten Ratten-Plazenten hat Nattan-Larrier allerdings nur 2 Fälle von Nekrosen gefunden. Es wird schwer sein, alle auch die kleineren Rupturen usw. nachzuweisen. Daß die Spirochaeten aber, von einer Verletzung aus erst einmal ins Gewebe gelangt, es geradezu überschwemmen, auch z. B. in die Epithelzellen der Haut von innen aus etwas besser einzudringen vermögen, zeigen Versuche mit künstlicher Verletzung der Rattenhaut. Schließlich muß darauf hingewiesen werden, daß ähnlich wie bei unsern perkutanen Versuchen an der Rattenhaut auch in der

genannten Arbeit ganz auffällig hervortritt, daß manchmal fast alle Versuche mißlingen. Der Autor selbst weiß dafür keine rechte Erklärung zu finden[1]).

Jedenfalls ist bei allen diesen Infektionen durch Schleimhäute und Gewebe weicher Organe nicht zu vergessen, daß in einem Falle die Spirochaeten sicher die Fähigkeit haben, Epithelien zu durchdringen — in den Zecken. Die Arbeit von Hindle (1911) hat uns darüber nähere interessante Aufschlüsse gebracht und gezeigt, daß bei höheren Temperaturen fast alle Organe des Zeckenkörpers von Spirochaeten befallen werden.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

Kurz zusammengefaßt sind die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die folgenden:

1. Die „perkutane" Infektion mit Rekurrensspirochaeten kann bereits 3 Minuten nach Aufträufeln des Blutes durch äußerliche Desinfektion nicht mehr verhindert werden. (Zu beachten wegen der nicht selten vorkommenden Laboratoriums-Infektionen mit Rekurrens.)

2. „Perkutane" Infektion gelang auch bei Hühnerspirochaeten, an befiederter und nicht befiederter Haut.

3. Aufträufeln von spirochaetenhaltigem Material auf die scheinbar unverletzte Haut führte bei Kaninchen-Syphilis zu keiner Infektion an Skrotalhaut und Epithelien des Präputialsackes, infizierte aber Sklera, Nickhaut und Kornea des Auges. (Man vergleiche den mitgeteilten Fall aus der Praxis, in dem eine Infektion des menschlichen Auges auf gleiche Weise erfolgte.)

4. „Perkutane" Infektion bei Rekurrensspirochaeten durch die äußere Körperhaut der Ratten setzt Epitheldefekte voraus, die immerhin so bedeutend sein müssen, daß sie nicht überall (also gewissermaßen normal) vorkommen. Bei meinen Versuchen waren diese Epitheldefekte nur mikroskopisch nachweisbar.

5. Bei Rekurrens und Hühnerspirochaetose ist bei „perkutaner" Infektion die Inkubationsdauer verlängert, bei Rekurrens außerdem die Menge der Spirochaeten im Blut verringert, bei Hühnerspirochaetose letzteres nicht. Ferner ist bei Rekurrens und Kaninchensyphilis (nicht bei Hühnerspirochaetose!) die Dauer der Infektion in der Regel bedeutend verlängert.

6. Wie die „perkutane" Infektion bei Kaninchen-Syphilis verläuft, bleibt noch zu untersuchen.

Literaturverzeichnis.

Babes (1907), Über das Eindringen der Tuberkelbazillen durch die Haut. Verh. der Naturforscher-Vers. zu Breslau 1907.

Battaglia (1910), Einige Untersuchungen über das Trypanosoma Nagana. Zentralbl. für Bakt. Orig. Bd. 53, 1910.

Bericht der deutschen Pestkommission. Berlin 1899.

[1]) Selbstverständlich ist, daß man bei diesen Versuchen jede Benetzung der Stücke, die nachher zur Schnittuntersuchung gelangen, mit infektiösem Blut vermeiden muß, da die Spirochaeten von Wunden aus sehr schnell in Gewebe eindringen.

Bohne (1908), Ein Fall von Febris recurrens americana. Arch. für Schiffs- u. Tropenhyg. Bd. 12, 1908.

Braunschweig (1889), Über Allgemeininfektion von der unversehrten Augenbindehaut aus. Fortschritte der Med. Bd. 24, 1889.

Conte (1893), Sur l'absorption des virus par les muqueuses. Baumgartens Jahresber. 1893.

Cornil (1890), Sur la pénétration des bacilles de la morve à travers la peau intacte. Sem. méd. 1890.

Cosanet (1903), Zitiert nach Neißer: Syphilisgift kann die gesunde Schleimhaut passieren, ohne Primäraffekte zu erzeugen. Thèse de Bordeaux 1903.

Erdmann (1910), Beiträge zur Morphologie und Entwicklungsgeschichte des Hammelsarkosporids in der Maus. Zentralbl. für Bakteriologie. Abt. I, Orig. Bd. 53.

Fränkel (1910), Über die Wirkung der Tuberkelbazillen von der unverletzten Haut aus. Hyg. Rundschau 1910.

Francis (1903), An exper. investigation on Tryp. Lewisi. Hyg. Lab. publ. health and mar. hosp. serv. U. S. Bull. 11. Washington 1903.

Fritsche (1902), Versuche über Infektion durch kutane Impfung bei Tieren. Arb. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte Bd. 18. 1902.

Garré (1885), Zur Ätiologie der akuten eitrigen Entzündung. Fortschritte der Med. Bd. 3, 1885.

Gozóny (1911), Infektionswege und natürliche Immunität bei Spirochaetosen. Zentralbl. f. Bakt. Abt. I, Orig. Bd. 57, 1911.

Hindle (1911), The Transmission of Spir. Duttoni. Parasitology Bd. IV, 1911.

Kolle (1901), Bericht über d. Tät. in der zu Studien über Pest eing. Stat. des Inst. f. Inf. 1899/1900. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 1901.

Königsfeld (1911), Über den Durchtritt von Tuberkelbazillen durch die unverletzte Haut. Zentralbl. f. Bakt. Abt. II, Orig. Bd. 60, 1911.

Kossel und Overbeck (1902), Bakteriologische Untersuchungen über Pest. Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte Bd. 18, 1902.

Laveran u. Mesnil (1904), Trypanosomes et Trypanosomiases. 1904.

Lévaditi et Roché (1909), La Syphilis. Paris 1909.

Liefmann (1905), Beitrag zum Studium der Ankylostomiasis. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 50.

Looß (1901), Über das Eindringen der Ankylostoma-Larven in die menschliche Haut. Zentralbl. f. Bakt. Abt. I, Orig. Bd. 29, 1901.

Derselbe (1903), Weiteres über die Einwanderung der Ankylostomen von der Haut aus. Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 33, 1903.

Derselbe (1904), Einige Bemerkungen zu Pieris kurzer Erwiderung usw. Zentralbl. f. Bakt. Abt. I, Orig. Bd. 35, 1904.

Manteufel (1907), Exper. Beiträge zur Kenntnis der Rekurrensspirochaeten. Arb. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte Bd. 27, 1907.

Derselbe (1908), Exper. Untersuchungen zur Epidemiologie des europäischen Rückfallfiebers. Ebenda Bd. 29, 1908.

Derselbe (1908), Weitere Untersuchungen über Rückfallfieber. Ebenda Bd. 29, 1908.

Derselbe (1910), Studien über die Trypanosomiasis der Ratten. Ebenda Bd. 33, 1910.

Martin u. Ringenbach (1910), Pénétration de Tryp. gambiense à travers les téguments et les muqueuses intacts. Bull. de la soc. de pathol. exot. Bd. 3, 1910.

Nattan-Larrier (1909), Pénétration du spirille de la fièvre recurrente à travers les téguments et les muqueuses intacts. Bull. de la soc. de pathol. exot. Bd. 2. 1909.

Derselbe (1911), L'hérédo-contagion des spirilloses. Ann. de l'Inst. Pasteur Bd. 25, 1909.

Neißer (1911), Bericht über die etc. 1905—1909 in Batavia und Breslau ausgeführten Arbeiten zur Erforschung der Syphilis. Arb. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte Bd. 37, 1911.

Perez (1897), Parasitissimo microbico latente nei gangli linfatici normali. Ann. d'Igiene sper. Bd. 7, 1897.

Rabinowitsch u. Kempner (1899), Beitrag zur Kenntnis der Blutparasiten. Zeitschr. für Hygiene u. Infektionskrankh. Bd. 30, 1899.

Römer (1906), Intraokulare Protozoeninfektion am Auge. Vortrag auf der 33. Vers. deutsch. ophthalm. Ges. Heidelberg 1906. Ref. in Zentralbl. f. Bakt. Ref. Bd. 39, 1907.

Roth (1888), Über das Verhalten der Schleimhäute und der äußeren Haut inbezug auf ihre Durchlässigkeit für Bakterien. Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh. Bd. 4.

Schaudinn (1904), Über die Einwanderung der Ankylostomen-Larven von der Haut aus. Deutsche med. Wochenschr. 1904.

Schuberg u. Kuhn (1911), Über die Übertragung von Krankheiten durch einheimische stechende Insekten. I. Teil. Arb. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte Bd. 31.

Simoncini (1903), Contributo allo studio delle ratione delle ghiandole linfatiche nelle infecione acute e croniche. Ann. d'Igiene sper. Bd. 13.

Uhlenhuth u. Groß (1908), Untersuchungen über die Spirillose der Hühner. Arb. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte Bd. 27, 1908.

Uhlenhuth u. Händel (1907), Vergleichende Untersuchungen der Rekurrens-Erkrankungen. Ebenda Bd. 26, 1907.

Uhlenhuth, Hübner u. Woithe (1908), Experimentelle Untersuchungen über Dourine. Ebenda Bd. 27, 1908.

Unna (1896), Die Einwanderung der Staphylokokken in die menschliche Haut. Deutsche med. Wochenschr. 1896.

Yakimoff u. Schiller (1907), Zur Trypanosomen-Infektion durch die Schleimhaut des Verdauungstraktes. Zentralbl. f. Bakt. Abt. I, Orig. Bd. 43, 1907.

Zur Kenntnis des Pebrine-Erregers, *Nosema bombycis* Nägeli.

Von

Dr. J. Ohmori,

Professor an der Kaiserl. Technischen Hochschule für Seidenbau in Uyeda, Japan.

(Hierzu Tafel II.)

Einleitung.

Die nachstehenden Untersuchungen sind dem Erreger der Krankheit gewidmet, die unter den Namen „Pébrine" (Frankreich), „Malattia dei Corpuscoli" oder „Mal delle petecchie" (Italien) und „Flecken- oder Körperchenkrankheit" (Deutschland) bekannt ist. Diese im höchsten Grade ansteckende, für die Seidenraupenzucht sehr gefährliche Krankheit ist in allen Ländern, in denen Seidenraupenzucht praktisch betrieben wird, beobachtet worden, so in Japan, China, Indien, in der Türkei, dem Kaukasus und in der Levante, in Italien, Frankreich und Österreich. In den Seidenkultur treibenden Ländern Europas hat die Pébrine etwa um die Mitte des vorigen Jahrhunderts eine derartige Verbreitung erfahren und trat mit so verheerender Wirkung auf, daß die Züchtereien in ganz außerordentlichem Maße bedroht waren und die gesamte Seidenkultur der gänzlichen Zerstörung zu verfallen drohte. Balbiani hat hierüber seinerzeit genauer berichtet, so daß auf seine Ausführungen verwiesen werden kann (1868)[1]).

In Japan tritt die Pébrine in derartig zerstörender Weise im allgemeinen nicht auf. Daß sie, im Gegensatze hierzu, in Europa so bedeutend größere Verluste in den Züchtereien herbeizuführen imstande war, beruht vielleicht auf klimatischen Einflüssen oder auf einer geringeren Widerstandsfähigkeit der in Europa gezüchteten Raupenrassen gegen die Seuche. Auch Pasteur hat schon die Vermutung ausgesprochen, daß die japanischen Rassen der Pébrine weniger leicht erliegen, als die europäischen Seidenraupen.

Eine historische Übersicht der früheren Literatur über den Erreger der Pébrinekrankheit, *Nosema bombycis* Nägeli, hat erst kürzlich Stempell in einer im Archiv für Protistenkunde veröffentlichten Arbeit gegeben (1909, S. 282 ff.). Es ist daher

[1]) Rapport de Jury international de l'exposition universelle de 1867. T. XII. 1868, S. 429. — Vergl. ferner die kurze Darstellung bei Doflein, Lehrbuch der Protozoenkunde 1909, S. 797.

nicht notwendig, an dieser Stelle nochmals auf die geschichtliche Entwicklung unserer Kenntnisse von den interessanten und in wirtschaftlicher Beziehung so außerordentlich wichtigen Parasiten zurückzukommen.

Stempell hat ferner in der soeben angeführten Schrift vor allem die Ergebnisse seiner eigenen Untersuchungen ausführlich mitgeteilt. Ich bin jedoch der Ansicht, daß auch diese neueste Bearbeitung eine endgültige Lösung aller, den Bau und die Lebensgeschichte des Pébrine-Erregers betreffenden Fragen noch nicht gebracht hat. Hierzu weitere Beiträge zu liefern, ist der Zweck der vorliegenden Mitteilung, die auch ihrerseits nicht den Anspruch erheben kann und will, alle Fragen beantwortet zu haben. Vielmehr bin ich mir voll bewußt, daß zukünftigen Untersuchungen noch mancherlei Arbeit vorbehalten bleibt.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden im Jahre 1910/11 im Laboratorium für Protozoenforschung des Kaiserlichen Gesundheitsamtes in Berlin unter der Leitung des Herrn Regierungsrats Prof. Dr. A. Schuberg ausgeführt, dem ich an dieser Stelle meinen vorzüglichsten Dank aussprechen möchte.

Allgemeine Symptome der Krankheit.

Sobald die Seidenraupen von der Krankheit ergriffen worden sind, beginnen sie untätig zu werden und verschmähen ihre gewöhnliche Nahrung. Die Folge davon ist, daß sie sich höchst unregelmäßig entwickeln. Einige von ihnen bleiben im Wachstum zurück, bleiben klein und schwächlich, während andere zu anormaler Größe heranwachsen. Diese Unregelmäßigkeit tritt am deutlichsten während der Zeit der Häutung in die Erscheinung. Während einige Raupen ihre Haut bereits abgeworfen haben, verfallen andere in eine Art Betäubung, ohne sich zu häuten; diese nennt man „Spätlinge". Wenn die Krankheit in ihr letztes Stadium eingetreten ist, nimmt die Raupe überhaupt kein Futter mehr an, sie verkrüppelt, wird kleiner und kleiner und geht schließlich zugrunde.

Sind die Raupen von der Krankheit sehr stark befallen, so tritt diese Verkrüppelung bedeutend schneller ein und erfolgt zuweilen schon vor dem Auskriechen der Raupe aus dem Ei. Schwächer erkrankte Tiere können dagegen zum Teil so lange am Leben bleiben, daß sie sich auch noch einspinnen.

Raupen, die schon vor dem Auskriechen aus dem Ei an Pébrine erkrankt sind, bleiben klein und schlaff, fressen wenig und erliegen zwischen der zweiten und dritten Häutung der Seuche. Später von der Krankheit befallene Tiere haben dasselbe kränkliche Aussehen, vermögen aber länger zu vegetieren. Werden die Raupen schließlich von der Krankheit erst nach der dritten Häutung ergriffen, so durchlaufen sie alle Entwicklungsstadien, bilden ihren Kokon, verpuppen sich, verwandeln sich in den Schmetterling und legen Eier ab. Ihre Geschlechtsprodukte bergen jedoch die Keime der Krankheit in sich. Die aus den infizierten Eiern hervorgegangenen Raupen gehen schon frühzeitig zugrunde, besonders bei heißer und feuchter Witterung. Sie stecken aber auch bald die gesunden Raupen an.

Die Infektion gesunder Raupen mit Pébrine erfolgt dadurch, daß sie mit kranken Tieren selbst oder mit deren Exkrementen in Berührung kommen oder daß ihnen mit

Pébrine infiziertes Laub als Futter dargereicht wird. Die Infektion kann sowohl mittels des Verdauungskanals durch mit der Nahrung aufgenommene Krankheitskeime, wie durch zufällig entstandene kleine Hautwunden erfolgen. Auf dieser doppelten Möglichkeit der Ansteckung beruht zum Teil die so außerordentlich verheerende Wirkung der Pébrine. Wird die Zucht der Seidenraupen nicht sehr sorgfältig ausgeführt und werden insbesondere infizierte Eier verwendet, so werden nur wenige Raupen zur weiteren Zucht reif.

Die Kokons infizierter Tiere sind gewöhnlich durch ihr krankhaftes mattes Aussehen, also schon allein durch ihre äußere Erscheinung als krank zu erkennen.

Die Pébrine ergreift alle Organe der Seidenraupe; den Darmapparat, die Muskulatur, das Fettgewebe, das Tracheenepithel, die Malpighischen Gefäße, die Seidendrüsen, das Nervensystem und die Anlagen der Geschlechtsorgane. Sie breitet sich außerordentlich schnell aus und hat in kürzester Zeit den ganzen Körper ergriffen, um schließlich den Tod herbeizuführen.

Zu den allgemeinen Krankheitserscheinungen gehört, daß nach der dritten Häutung und besonders im fünften Entwicklungsstadium (d. h. nach der vierten Häutung) an allen Teilen des Raupenkörpers bräunlichschwarze Flecken auftreten, die wie Brandwunden aussehen und besonders am Sporn, an den Beinen, am Rücken und dem ganzen hinteren Teil des Körpers unregelmäßig verteilt erscheinen. Diese Flecken sind charakteristische äußere Merkmale der Krankheit, die deshalb auch oft mit dem Namen „Fleckenkrankheit“ bezeichnet wird. Verursacht werden die Flecken durch das Vorhandensein des Parasiten in Hypodermiszellen, die oft mit zahllosen Sporen erfüllt sind. Bei den japanischen Rassen der Seidenraupe sind Flecken weniger deutlich zu erkennen und nicht so zahlreich vorhanden, als bei den europäischen. Die Anwesenheit der Flecken ist stets ein Zeichen, daß die Erkrankung bereits weit vorgeschritten ist. Die mit ihnen behafteten Tiere fressen wenig, bleiben klein, schrumpfen zusammen und gehen schließlich zugrunde.

Bei starker Infektion bilden sich in den befallenen Organen und Geweben geschwulstartige Knoten, die an den Seidendrüsen besonders deutlich und sogar mit bloßem Auge wahrgenommen werden können. Die gesunden Seidendrüsen haben im allgemeinen ein gallertiges Aussehen; erkrankte Teile sind dagegen durch milchweiße Flecken von verschiedener Gestalt und Größe gekennzeichnet.

Material und Technik der Untersuchung.

Zur Untersuchung der Lebensgeschichte des Pébrine-Erregers ist die künstliche Infektion von Raupen unumgänglich notwendig. Ich bin Herrn J. Bolle, Direktor der k. k. landwirtschaftlich-chemischen Versuchsstation in Görz, sehr zu Danke verpflichtet, daß er mir durch freundliche Überlassung geeigneten Materials ermöglicht hat, Infektionsversuche auch hier in Deutschland auszuführen. Das Material bestand aus gesunden Tieren der zweiten Generation (Bivoltinrasse) und kranken weiblichen Schmetterlingen der ersten Generation, die ihre Eier bereits abgelegt hatten und große Mengen von lebenden Sporen enthielten. Ich züchtete die gesunden Raupen im Labo-

ratorium auf Maulbeerblättern mit großer Sorgfalt bis zum Ende ihres vierten Stadiums und infizierte sie dann mit Sporen.

Die Infektion, die mir für meine Untersuchungen ein ausgezeichnetes Material lieferte, wurde auf folgende Weise ausgeführt.

Ich wählte stark infizierte Schmetterlinge, zerrieb diese und vermischte sie mit physiologischer Kochsalzlösung. Die so gewonnene breiige Flüssigkeit wurde nochmals mit dem Mikroskop auf das Vorhandensein von Sporen geprüft und dann ein Tropfen hiervon mittels einer Spritze durch den After in den Verdauungskanal der gesunden Raupen eingeführt. Die so infizierten Tiere wuchsen, ohne Beschädigungen nach der Operation zu zeigen, in normaler Weise heran. Einzelne Exemplare wurden zuerst nach 1, dann nach 2 und 3, bis nach 8 Tagen in verschiedenen Flüssigkeiten fixiert.

Am besten bewährte sich Sublimat-Alkohol-Eisessig (konzentrierte wässerige Sublimat-Lösung 50 ccm, Alkohol absol. 50 ccm, Eisessig 5 ccm).

Das konservierte Material wurde auf dem gewöhnlichen Wege in Paraffin eingebettet und in 3—5 μ dicke Schnitte zerlegt.

Zur Färbung der Paraffinschnitte verwandte ich verschiedene Methoden, so z. B. Weigertsches Eisenhämatoxylin und Eisenhämatoxylin nach Heidenhain. Die besten Ergebnisse erhielt ich jedoch mit der von Schuberg angegebenen Modifikation der Giemsa-Färbung. Man behandelt die Schnitte wie sonst, färbt sie in dem wie üblich verdünnten Giemsa-Gemisch (ein Tropfen auf 1 ccm Wasser) drei Stunden, wäscht in Wasser aus, vermeidet jedoch dann den Alkohol und führt durch Azeton, das einmal gewechselt wird, und dann durch Xylol in dicken Kanadabalsam über. Mit dieser modifizierten Giemsa-Färbung gelingt es, die Kerne in den Parasiten leuchtend rot zu färben, während das Protoplasma in der Regel einen blauen Ton annimmt. Die Färbung ist dann am besten, wenn auch das Chromatin der Gewebezellen einen purpurroten Ton zeigt; ist dieses blau gefärbt, so erscheint auch die Kernfärbung des Parasiten weniger gut.

Dieses Verfahren ist in sehr vielen Fällen auch zur Färbung der Sporen geeignet.

Bau und Entwicklung von Nosema bombycis.

Nach der bis vor kurzem allgemein angenommenen Auffassung, die z. B. auch in der 2. Auflage von Dofleins Lehrbuch der Protistenkunde (1909, S. 796) vertreten wurde, sollte *Nosema bombycis* „lappige Massen bilden, welche in der Form verschieden sind, je nach den Geweben, welche befallen sind. Diese Körper enthalten zahlreiche kugelige Pansporoblasten, welche einer großen Anzahl von Sporen den Ursprung geben".

Im Gegensatze zu dieser Anschauung vom Bau und der Entwicklung des Pébrine-Erregers berichtete Pérez schon 1905, daß ihm Mesnil Präparate von *Nosema bombycis* gezeigt habe, in denen man „kleine ovoide Körper mit zwei kleinen Chromatinmassen finde, die jedenfalls vegetative Stadien des Parasiten wären, und die sich anscheinend durch Zweiteilung vermehrten"[1]). Bei der in Krabben lebenden Micro-

[1]) Zitat nach Auerbach (1910a, S. 125).

sporidienform, mit welcher Pérez die Befunde Mesnils in Beziehung bringt, werde jeder Meront für sich im Ganzen zu einer Spore umgebildet. Auch Léger und Hesse sprachen 1907 von „sporoblastes monosporés" des *Nosema bombycis*. Die Mitteilungen von Pérez erinnern, worauf Auerbach mit Recht hinweist, an die Angaben der älteren Literatur, besonders auch von Pasteur, daß sich die Pébrinekörper durch Querteilung (Bipartition) vermehrten (Auerbach, 1910a, S. 125). Sie fanden ihre Bestätigung in den Veröffentlichungen Stempells (1907, 1909a, 1909b). Nach Stempell bilden den Ausgangspunkt der Entwicklung kleine, in der Blutbahn der Raupe lebende amöboide „Planonten", die sich durch Zweiteilung vermehren sollen und schließlich in die verschiedensten Gewebezellen eindringen. Hier werden sie alsbald, indem sie etwas heranwachsen und ihre Beweglichkeit verlieren, zu Meronten, kugeligen oder eiförmigen Zellen, welche sich lebhaft durch Zweiteilung, Knospung oder Vielteilung vermehren und schließlich die ganze von ihnen befallene Zelle ausfüllen, aber wohl niemals in andere Zellen hineinwachsen (1909b, S. 297). Diese Meronten verwandeln sich, sobald in der befallenen Zelle Nahrungs- oder Platzmangel eintrete, direkt in Sporen.

Eine große Mannigfaltigkeit soll den Kernformen der Meronten zukommen. Besonders bemerkenswert aber erscheint die Angabe, daß sich das Protoplasma bei der Teilung sehr verschieden verhalte und daß man „alle drei überhaupt bei Protozoen vorkommenden Vermehrungstypen, Zweiteilung, Knospung und Vielteilung, dabei beobachten könne". Am häufigsten sei Zweiteilung unter gleichzeitiger Verlängerung der beiden Teilsprößlinge in der Teilungsrichtung, ein Vorgang, der sich auch am lebenden Objekte verfolgen lasse und durch Wiederholung vor Beendigung der ersten Durchschnürung zur Bildung von Ketten führen könne. Zuweilen komme es auch zur Bildung von „wurstförmigen Parasiten" mit bis zu sieben Kernen. Speziell bei dieser Form der Teilung seien Fälle beobachtet worden, in denen die Sprößlinge nicht von gleicher Größe waren, „wo man also von einer Knospung reden konnte". Schließlich aber komme noch „ein weiterer Modus der Zweiteilung" vor, „bei welchem die äußere Kontur des sich teilenden Mutterindividuums zunächst gar nicht verändert wird, indem nach vollendeter Kernteilung eine Furche auftritt, die gerade wie bei der Furchung einer Eizelle das Protoplasma gewissermaßen innerlich in zwei halbkuglige Hälften zerlegt".

Von diesen verschiedenen, durch Stempell beschriebenen Teilungsarten habe ich selbst nur eine beobachtet. Die schönsten und klarsten Stadien fand ich in der Muskulatur des Darmes. Diese erscheint mir aus dem Grunde für die Untersuchung besonders geeignet, weil der geringe Durchmesser der Gewebselemente bedingt, daß sich die Parasiten meist nur in einfacher Schicht ausgebreitet zeigen.

Daß die Muskulatur des Darmes infiziert werden kann, ist schon von früheren Autoren, so von Balbiani beobachtet worden (1884, S. 158); auch Stempell hat dies gesehen und berichtet, daß die Darmmuskulatur ungefähr gleich schnell mit den Darmepithelzellen infiziert wird. Diese Angabe kann ich bestätigen; denn auch ich fand bei künstlicher Infektion die Darmmuskulatur schon frühzeitig von den Parasiten ergriffen. Eine Abbildung infizierter Darmmuskelzellen hat Stempell nicht gegeben.

In der Regel ist nur ein Teil der Muskelelemente von den Parasiten erfüllt, die zum Teil in einem deutlich abgegrenzten Hohlraum enthalten sind. Die Art und Weise ihrer Verteilung in demselben erweckt nicht den Eindruck, daß er nur der Konservierung seine Entstehung verdankt; ich halte es vielmehr für wahrscheinlich, daß er auch am lebenden Objekte vorhanden ist und durch die Einwirkung der Parasiten auf die Wirtszelle entsteht. Auch Stempell (1909b, S. 302) ist der Ansicht, „daß die Meronten das Protoplasma der von ihnen befallenen Zellen verflüssigen". Ob die Verflüssigung allerdings gerade „durch peptonisierende Fermente vorbereitet" wird, wie Stempell annimmt, muß wohl zunächst dahingestellt bleiben, wenngleich es immerhin nicht als unmöglich bezeichnet werden kann.

Die Entwicklungsstadien nun, die ich in den Muskeln des Darmes fand, waren folgende.

Die einfachsten waren einzeln in den Muskelfasern liegende einkernige oder zweikernige, rundliche oder unregelmäßiger begrenzte Körper, deren Protoplasma sich bei Giemsafärbung (auf Schnitten) durch seine reine Blaufärbung von der rosa gefärbten Muskelsubstanz sehr deutlich abhob; der oder die Kerne waren leuchtend purpurrot gefärbt (Fig. 1, 2, 3). Die gleiche Färbung von Kern und Protoplasma der Parasiten gilt übrigens, wie hier allgemein bemerkt sei, auch für die weiteren beschriebenen Stadien, die ausnahmslos in Schnitten beobachtet wurden. Bemerkenswert ist, daß bei den abgebildeten einzeln gefundenen ein- und zweikernigen Formen der oben erwähnte, die Parasiten sonst regelmäßig umschließende Hohlraum nicht vorhanden ist. Wenn hierbei nicht eine Zufälligkeit in Betracht kommt, was bei der relativen Seltenheit dieser Stadien immerhin nicht ganz ausgeschlossen ist, so kann man geneigt sein, daran zu denken, daß es sich um erst kürzlich in die Muskelfasern eingedrungene Elemente handelt, welche einen Hohlraum um sich noch nicht zur Ausbildung gebracht haben. Welche weitere Stadien sich an diese Formen anschließen, falls sie wirklich den Beginn der Infektion einer Muskelfaser darstellen, läßt sich nur auf Grund von Kombinationen vermuten. Ich glaube jedoch die Annahme, daß die in Fig. 4, 5 und 6 abgebildeten Formen an sie anzureihen sind, nicht als unwahrscheinlich bezeichnen zu dürfen. Fig. 4 zeigt, außer einem einkernigen und einem zweikernigen, drei mehr in die Länge gestreckte Parasiten, von denen die beiden kleineren drei, der größere sechs Kerne enthält. In der in Fig. 5 abgebildeten Muskelfaser sind dagegen ein einkerniger, zwei zweikernige, zwei dreikernige, ein vierkerniger, ein fünfkerniger und ein sechskerniger Parasit enthalten. Ihre Länge ist der Zahl der Kerne proportional; je mehr Kerne sie enthalten, desto länger sind sie. Fig. 6 schließlich läßt außer zwei dreikernigen und einem großen, sehr in die Länge gestreckten achtkernigen Stadium drei einkernige und ein zweikerniges erkennen. Formen, die mehr als acht Kerne enthielten, wurden nicht beobachtet.

Sehr bemerkenswert ist, daß in dem achtkernigen Stadium die Kerne zu vier Paaren angeordnet sind. Sowohl aus dieser Kerngruppierung wie aus den Umrissen des Körpers gewinnt man den Eindruck, daß der ganze langgestreckte Parasit im Begriffe steht, in vier zweikernige Stadien zu zerfallen. Verstärkt wird dieser Eindruck durch das Vorkommen der in Fig. 7, 8 und 9 wiedergegebenen Bilder. In

Fig. 8 enthält die Muskelfaser vier zweikernige Parasiten, die sehr wohl aus einem derartigen achtkernigen Stadium, wie es in Fig. 6 vorhanden ist, entstanden sein könnten. Die gleiche Möglichkeit besteht für Fig. 7, wenn man die nicht unberechtigte Annahme macht, daß ein vierter Parasit in einen der angrenzenden Schnitte gefallen ist. Fig. 9 schließlich zeigt außer mehreren zweikernigen auch einkernige Stadien, von denen man vermuten möchte, daß sie durch Teilung der zweikernigen entstanden sind. Daß die in diesem Schnitte enthaltenen Formen nicht die Gesamtheit der in der betreffenden Muskelfaser vorhandenen Parasiten bildeten und daß deren Gesamtzahl eine größere war, kann wohl aus der bedeutenderen Größe der Muskelfaser und des von dieser umschlossenen Hohlraums gefolgert werden; ein Teil der Faser wie der in ihr enthaltenen Parasiten dürfte in benachbarte Schnitte gefallen sein, was sich allerdings in dem betreffenden Präparat leider nicht beweisen ließ. Die in Fig. 7—9 dargestellten Formen sind zwar verhältnismäßig größer als die in Fig. 5 und 6 abgebildeten; dies spricht indessen nicht dagegen, daß sie aus Stadien der letzteren Art entstanden sind. Denn ein Vergleich der Fig. 5 und 6 mit Fig. 4 lehrt, daß die Stadien gleicher Art in den Größenverhältnissen nicht immer völlig übereinstimmen. Es darf ferner daran erinnert werden, daß, wie schon lange bekannt ist und unten noch zu erwähnen sein wird, auch die Größe der Sporen bei den Microsporidien in recht beträchtlichem Umfange wechselt.

Man könnte nun allerdings auch geneigt sein, die Ansicht zu vertreten, daß die in Fig. 8—10 abgebildeten Formen erst kürzlich in die Muskelfaser eingedrungene, noch auf dem Stadium der Zweiteilung befindliche Parasiten seien. Mit Sicherheit läßt sich diese Möglichkeit nicht ausschließen. Immerhin scheint mir das Vorhandensein größerer Hohlräume um die Parasiten, wie sie besonders Fig. 9 und 10 zeigen, dafür zu sprechen, daß es sich um schon länger infizierte Muskelfasern handelt, daß also auch die in ihnen eingeschlossenen Stadien schon eine gewisse Entwicklung durchlaufen haben. Die Ansicht, daß die zweikernigen Formen von Fig. 7—10 durch Zerfall achtkerniger (d. h. 2×4 kerniger) Stadien (vergl. Fig. 6), und daß die einkernigen durch Teilung dieser zweikernigen Formen entstanden sind, scheint mir daher mehr Berechtigung zu haben, als die Meinung, daß man es mit Anfangsstadien der Entwicklung zu tun habe.

Zusammenfassend läßt sich aus den beschriebenen Stadien wohl schließen, daß die intracellulären Formen von *Nosema bombycis*, von einem einkernigen Stadium ausgehend, zu langgestreckten achtkernigen, mit paarig angeordneten Kernen versehenen Formen heranwachsen, daß diese wahrscheinlich in zweikernige, und daß die letzteren wieder in einkernige Formen zerfallen. Diese Vermehrung ist als die Schizogonie aufzufassen.

Schon bei *Thelohania mülleri* hat Stempell (1902) das Auftreten von rosenkranzähnlichen Ketten beschrieben; ebenso fand Edm. Hesse bei *Thelohania legeri* kurze Ketten von drei Sprößlingen (1904). Wie schon oben erwähnt, hat dann Stempell auch bei *Nosema bombycis* kettenförmige Stadien beobachtet und schließlich sah O. Schröder ebensolche bei *Thelohania chaetogastris*. Stempell ist nun der Meinung, daß Zweiteilung unter gleichzeitiger Verlängerung der beiden Teilsprößlinge

in der Teilungsrichtung am häufigsten ist (1909, S. 304), daß die Kettenbildung oft eintritt und daß es zuweilen vorkommt, daß die Protoplasmateilung zunächst ganz unterbleibt und wurstförmige Parasiten entstehen. Er glaubt also offenbar, daß Ketten nur dann zustandekommen, wenn gewissermaßen die Teilung der Kerne so rasch vor sich geht, daß das Protoplasma nicht mehr nachkommen kann. Schröder schließt sich Stempell an, auf dessen Angaben er verweist (1909, S. 121). Auch er spricht von fortgesetzter Teilung, wobei aber die Teilhälften sich „oft" nicht ganz trennen, sondern noch im Zusammenhange bleiben. Bemerkenswert ist nun, daß Stempell in den von *Nosema bombycis* beschriebenen „wurstförmigen Parasiten" „bis sieben Kerne" gezählt und daß Schröder, nach seinen Abbildungen, bei *Thelohania chaetogastris* im Höchstfalle acht Kerne beobachtete. Die höchste Zahl von Kernen, die ich selbst fand, war, wie oben erwähnt, ebenfalls acht. Diese Tatsachen legen doch den Gedanken nahe, daß die oben vermutete Art der Entwicklung die Regel darstellen möchte, d. h. daß die Parasiten zu einem langgestreckten, wurst- oder rosenkranzförmigen achtkernigen Stadium heranwachsen, das in vier je zweikernige Teile zerfällt, die sich wieder ihrerseits in je zwei einkernige Stücke zerteilen. Daß schließlich „rundliche zweikernige Stadien" gebildet werden, „die sich in die Länge strecken, eine hantelförmige Gestalt annehmen und sich schließlich durchschnüren", ist auch die Ansicht Schröders für *Thelohania chaetogastris*. Der einzige Unterschied zwischen seiner und meiner Auffassung besteht nur darin, daß er wenigstens am Anfang der Entwicklung auch eine Durchtrennung von noch nicht achtkernigen Stadien zuläßt. Im übrigen zeigt ein Vergleich meiner eigenen Abbildungen mit denen Schröders eine überraschend große Übereinstimmung.

Daß bei den von Stempell und Schröder abgebildeten Stadien diejenigen, die weniger als acht Kerne enthalten, an Zahl überwiegen, was auch mit meinen eigenen Beobachtungen übereinstimmt, ist durchaus begreiflich, da ja besonders ein- und zweikernige Stadien nicht nur bis zur Erreichung des achtkernigen Stadiums, sondern auch wieder bei deren Zerfall durchlaufen werden; sie müssen also an Zahl viel häufiger sein als die mehrkernigen, speziell die achtkernigen.

Es muß ausdrücklich zugegeben werden, daß die hier vertretene Auffassung des Entwicklungsgangs auf einer Kombination der verschiedenartigen nebeneinander gefundenen Stadien beruht. Das gleiche gilt aber in nicht geringerem Maße von der Deutung Stempells. Die einzige Angabe über Beobachtungen am lebenden Objekte, die meines Wissens vorliegt, ist die Stempells über die „Zweiteilung unter gleichzeitiger Verlängerung der beiden Teilsprößlinge in der Teilungsrichtung"; „da dieser Vorgang relativ schnell von statten geht, so läßt er sich ganz gut am lebenden Objekt direkt verfolgen". Diese Beobachtung widerspricht aber der obigen Auffassung keineswegs, da ja eine derartige Teilung auch nach ihr vorkommt.

Was aber besonders für die Richtigkeit der vorgetragenen Entwicklungsweise spricht, das ist deren größere Einheitlichkeit und Regelmäßigkeit. Nach Stempell und Schröder soll sowohl fortgesetzte Zweiteilung wie Kettenbildung vorkommen, nach Stempell soll sogar außerdem „Knospung und Vielteilung" eintreten können. Das gleiche Entwicklungsstadium soll also auf verschiedenem Wege erreicht werden

können, was mir nicht recht einleuchten will. Die von Stempell beschriebene „Knospung“ und „Vielteilung“ habe ich nicht gefunden und kann seine Angaben hierüber auch nicht für beweisend halten; die Abbildungen der so gedeuteten Stadien können auch sehr wohl in anderer Weise gedeutet werden und würden jedenfalls nur vereinzelte Zustände derartiger Entwicklungsvorgänge wiedergeben.

Dagegen stimme ich Stempell zu, wenn er die Bildung von Pansporoblasten bei *Nosema bombycis* in Abrede stellt. Nach der noch bei Doflein vertretenen älteren Auffassung sollten sich Pansporoblasten finden, welche zahlreiche Sporoblasten enthalten. Wenn Pansporoblasten zur Ausbildung kämen, so müßten sie wohl aus den letzten einkernigen Stadien der Schizogonie entstehen. Nach Stempell ist dies nicht der Fall; es werden vielmehr die Endstadien der Schizogonie (Merogonie nach Stempell) direkt zu Sporoblasten, die sich in je eine Spore umwandeln.

Bei der großen Ähnlichkeit, welche die von mir bei *Nosema bombycis* beobachteten Stadien der Schizogonie mit jenen besitzen, die O. Schröder von *Thelohania chaetogastris* beschreibt, ist es wohl angebracht, auch für die weitere Entwicklung diese Form zum Vergleich heranzuziehen.

Nach Schröder soll sich aus den Sporonten nach wiederholter Kernteilung ein kreuzförmiges vierkerniges, und aus diesen durch eine weitere Zweiteilung der Kerne ein achtkerniges Stadium entwickeln, das zur Bildung von acht einkernigen, zunächst noch rosettenartig zusammenhängenden Sporoblasten führt. Die Pansporoblastenhülle, die diese Stadien umhüllt, ist äußerst zart.

Nach Stempell finden sich, wie gesagt, bei *Nosema bombycis* derartige Stadien nicht. Die Bildung von Pansporoblasten unterbleibt und die Endstadien der Schizogonie verwandeln sich direkt in Sporen. Auch ich habe einen Entwicklungsgang, wie ihn Schröder für *Thelohania chaetogastris* angibt, bei *Nosema bombycis* nicht nachweisen können. Ich kann jedoch an dieser Stelle nicht unerwähnt lassen, daß ich einige Male rundliche mehrkernige Stadien antraf, deren Bedeutung mir anfangs nicht ganz klar erschien. Sie waren von einer feinen Hülle umgeben und machten dadurch den Eindruck von Pansporoblasten. Auch mehrere ein- oder zweikernige Stadien oder reife Sporen konnten von einer derartigen Hülle umgeben sein (Fig. 11 bis 18, 26). Es ist jedoch auch möglich, daß es sich hierbei um Stadien der Schizogonie handelte, die in quergeschnittenen Muskelfasern liegen, und daß die scheinbare Pansporoblastenhülle durch den dünnen Rest der umhüllenden Muskelfaser vorgetäuscht wird. Diese Auffassung halte ich für die wahrscheinlichere. Da in meinen Präparaten sowohl die Schizogonie wie reife Sporen vorhanden waren, so müßten jene Stadien, falls sie sich zwischen Schizogonie und Sporen einschieben würden, wohl öfter angetroffen werden, als es tatsächlich der Fall war. Ich glaube daher wie Stempell, daß die Bildung der Sporen bei *Nosema bombycis* direkt, ohne Zwischenschaltung einer Pansporoblastenbildung erfolgt.

Als junge, in der Entwicklung begriffene Sporen möchte ich Fig. 24 und 25 betrachten. Beide besitzen nur einen Kern; bei 25 hat sich das Protoplasma bereits zur Bildung einer Vacuole zurückgezogen.

Die fertigen Sporen besitzen, wie bekannt, in ungefärbtem Zustande, bei Untersuchung in Wasser die bekannte langgestreckte, oft etwas bohnenförmige Gestalt und erscheinen ziemlich stark lichtbrechend (Fig. 19—23). Die Untersuchung ihrer feineren Bauverhältnisse ist besonders mit Rücksicht auf die Kleinheit mit großen Schwierigkeiten verbunden.

Betreffs des Baues der Microsporidiensporen stehen sich zurzeit zwei Ansichten gegenüber. Die eine Ansicht, welche sich an die zurzeit für die Myxosporidiensporen geltende Auffassung anschließt, wird besonders von Stempell, von Léger und Hesse, von Mercier und von O. Schröder vertreten. Nach ihr treten besondere Polkapsel- und Schalenkerne auf, und zwar ein Polkapselkern und zwei Schalenkerne. Bezüglich der Kerne des Amöboidkeims stimmen die Autoren, deren Angaben sich übrigens auf verschiedene Arten beziehen, nicht ganz überein. Nach Stempell besitzt die Spore von *Nosema anomalum* vier Kerne, von denen zwei als Polkapselkerne, zwei als Amöboidkeimkerne aufzufassen seien. Nach Léger und Hesse (1907) enthält das Sporenplasma zwei, oder einen, dann etwas größeren Kern. Für *Thelohania giardi* beschreibt Mercier (1908) zwei Kerne des Amöboidkeimes, die sich in manchen Sporen durch Teilung jeden Kernes auf vier vermehren sollen. Bei *Thelohania chaetogastris* läßt das Plasma der Spore nach O. Schröder entweder zwei oder nur einen Kern erkennen. Schließlich ist die hier besonders interessierende Angabe Stempells über *Nosema bombycis* anzuführen, nach welcher der Amöboidkeim ursprünglich einkernig ist, dann durch amitotische Teilung zwei Kerne enthält und schließlich, nach Aufnahme der Spore in einen neuen Wirt, durch wiederholte Kernteilung vierkernig wird[1]).

Alle oben genannten Autoren stimmen darin überein, daß die Microsporidienspore eine besondere Polkapsel besitzt.

Im Gegensatze zu diesen Anschauungen stehen die Angaben Schubergs für die im Hoden der Barbe beobachtete *Plistophora longifilis*. Schuberg fand bei dieser Art, sowohl in den Sporoblasten, wie in den Sporen stets nur einen Kern; er stellt ferner das Vorhandensein einer besonderen „Polkapsel" in Abrede. Nach seinen Beobachtungen ist der Polfaden vielmehr unmittelbar in die Spore eingeschlossen und, dicht der Sporenhülle anliegend, in der großen, hinteren Vacuole aufgerollt. Die Angaben der anderen Autoren über das Vorkommen von mehreren Kernen in den Sporen sollen zum Teil dadurch ihre Erklärung finden, daß in diesen, und zwar sowohl in der vorderen, wie in der hinteren Vacuole mehr oder weniger körnige oder klumpige Gebilde vorkommen, die „metachromatischen Körner", die nach ihrem sehr wechselnden Aussehen und ihrem färberischen Verhalten nicht als Kerne angesprochen werden dürfen, vielmehr — vermutungsweise — als bei der Konservierung entstandene Produkte des Vacuoleninhaltes angesehen werden[2]).

---

[1]) Auerbach (1910b, S. 776) gibt für die reife Spore von *Plistophora ovicola* vier Kerne an, ohne sich über deren Natur genauer zu äußern.

[2]) Diese Ansichten Schubergs hat Stempell (1910, S. 805) zu widerlegen versucht, jedoch ohne Angabe neuer Tatsachen. Da Herr Prof. Schuberg auf die Stempellsche Erwiderung selbst zurückzukommen beabsichtigt, kann ich es unterlassen, hier genauer auf sie einzugehen.

Zur Entscheidung dieser Frage sind die Sporen von *Nosema bombycis* kein sehr günstiges Objekt. Nach meinen Messungen beträgt ihre durchschnittlich größte Länge etwa 2—4 μ und geht im allgemeinen nicht über 4 μ hinaus, bei einer Breite von 1—2 μ. Diese Maße stimmen mit den von Stempell angegebenen annähernd überein. Nach Stempell beträgt „ihre wahre durchschnittliche Länge 4 μ, ihre Breite 2 μ". Allerdings kämen auch erheblich anormale Größenvariationen vor; eine Spore von 6 μ Länge und 4 μ Breite wird aber von Stempell schon als „Riesenspore" bezeichnet. Demgegenüber sind die größeren Sporen von *Plistophora longifilis*, an denen Schuberg seine Untersuchungen hauptsächlich ausführte, bis zu 12 μ lang und etwa 6 μ breit; sie sind also annähernd dreimal so groß, als die durchschnittlich größten Sporen von *Nosema bombycis*, und deshalb zur Entscheidung der ihren Bau betreffenden Fragen entsprechend günstiger als diese. Soweit daher Verhältnisse in Betracht kommen, von denen anzunehmen ist, daß sie den Sporen aller Microsporidien eigentümlich sein dürften, sind an den kleinen Sporen angestellte Beobachtungen, welche den aus der Untersuchung der großen Sporen gewonnenen Ergebnissen widersprechen, wohl mit vorsichtiger Zurückhaltung zu beurteilen.

Schon Schuberg (1910, S. 416) hat darauf aufmerksam gemacht, daß eigentliche Beweise für das Vorhandensein einer besonderen Polkapsel in den Sporen der Microsporidien fehlen, insbesondere bei den neueren Autoren. Stempell (1904) und Mercier bilden sie nur in schematischen Abbildungen ab und O. Schröder macht bei dem von ihm als Polkapsel bezeichneten Gebilde keinerlei Angaben über den Polfaden. In seiner Arbeit über *Nosema bombycis* glaubt Stempell den Beweis für das Vorhandensein der Polkapsel durch seine Photographien mit ultraviolettem Lichte erbracht zu haben. Daß in diesen Photographien (Fig. 7—11) einige Querlinien vorhanden sind, soll ebensowenig bestritten werden, als daß diese Querlinien auf das Vorhandensein des Polfadens zurückzuführen sind. Die Abgrenzung der wohl als Polkapsel in Anspruch genommenen mittleren Partie der Spore aber ist kaum schärfer, als in den in Fig. 98—101 wiedergegebenen Zeichnungen, von denen Stempell selbst sagt (1909b, S. 315), daß sie, „wie man ja auch nach der theoretischen Berechnung erwarten müsse, noch viel zu unklar seien, um eine sichere Anschauung vom inneren Bau der Spore vermitteln zu können".

An den Sporen von *Nosema bombycis* habe ich selbst keinerlei Strukturen, die für das Vorhandensein einer Polkapsel sprächen, wahrnehmen können. Ich gebe zu, daß die Beobachtung hier außerordentlich schwierig ist, muß aber gerade deshalb auch betonen, daß die so kleinen Sporen dieser Form nicht als ein zur Lösung der bestehenden Streitfragen besonders geeignetes Objekt angesehen werden dürfen. Ich glaube daher, mich der Auffassung Schubergs anschließen zu müssen, der, wie oben erwähnt, für *Plistophora longifilis* den Nachweis erbrachte, daß der Polfaden, unmittelbar von der Sporenhülle umschlossen, dieser Hülle dicht anliegend in der großen Vacuole aufgerollt ist, und daß eine eigentliche Polkapsel den Sporen der Microsporidien fehlt.

Die aus den oben angeführten Gründen an sich geringere Beweiskraft der Angaben über die kleinen Sporen von *Nosema bombycis* wird aber noch mehr gemindert,

wenn es gelingt, auch an ihnen Verhältnisse aufzufinden, welche mit den an den großen Sporen von *Plistophora multifilis* beobachteten übereinstimmen.

Dies trifft für die Kernverhältnisse zu.

Über die Lage und Form des Protoplasmakörpers in der Spore stimmen die Angaben von Stempell und Schuberg und den meisten anderen Autoren überein. Wie ich bestätigen kann, bildet er eine die Mitte der Spore einnehmende Zone, deren Ausdehnung ebenso wie der von ihr an den Polen freigelassenen vorderen und hinteren Vacuole zum Teil vom Grade der Reife abhängt. Daß diese Protoplasmazone durchbrochen ist, also einen Ring darstellt, wie es Stempell für *Nosema anomalum* und Schuberg für *Plistophora longifilis* zeigen konnten, läßt sich bei der Kleinheit des Objektes nicht nachweisen, ist aber wohl anzunehmen.

Innerhalb dieser Protoplasmazone nun fand ich einen oder zwei Kerne (Fig. 26 bis 45). Sind zwei Kerne vorhanden, so liegen sie dicht beieinander, entweder neben- oder hintereinander, aber auch schräg mit Beziehung auf die Längsachse der Spore (Fig. 26, 31—33, 38—41, 44—45). Außer den Kernen, die als kleine kugelige Körnchen erscheinen, finden sich nun in den Sporen häufig auch mehrere andere färbbare Körner, welche von anderen Autoren zum Teil ebenfalls als Kerne gedeutet werden. Diese Körner liegen aber nicht im Protoplasma, sondern in den den vorderen oder hinteren Pol der Sporen einnehmenden Vacuolen. Ihre Zahl, Lage und Anordnung ist verschieden und in größeren Sporen erscheinen sie auch von wechselnder Größe. Mitunter findet man nur in einer Vacuole ein der Sporenwand anliegendes Körnchen (Fig. 28 und 40), in anderen Fällen dagegen in jeder Vacuole ein solches (Fig. 34 und 39); es können aber auch zwei oder drei Körnchen in einer Vacuole liegen und in der anderen gar keines (Fig. 29—31, 36—38), oder in einer Vacuole drei und in der anderen eins (Fig. 35). Diese verschiedenen Fälle fand ich besonders in Präparaten von kleinen Sporen, bei denen auch die Kerne sehr deutlich gefärbt waren[1]).

Bei einigen größeren Sporen fand ich jedoch sogar noch zahlreichere und ziemlich unregelmäßig verteilte Körnchen (Fig. 41—42). Diese letzteren erinnerten sehr an Fälle, wie sie Schuberg bei *Plistophora longifilis* gesehen hat (1910, Fig. 10).

In der Deutung dieser in den Vacuolen liegenden Gebilde schließe ich mich Schuberg an. Da alle diese Körnchen nicht im Protoplasma der Spore, sondern deutlich in den Vacuolen liegen, halte auch ich es für ausgeschlossen, daß es sich um Kerne handelt. Auch die Unregelmäßigkeit ihrer Zahl und Verteilung spricht durchaus dagegen, sie als solche aufzufassen. Schuberg hat die Vermutung ausgesprochen, daß die Körnchen, die er als „metachromatische Körner" bezeichnet, durch klumpige Zusammenballung einer schleimig-gallertigen, den Sporenhohlraum erfüllenden Substanz entstanden sein könnten, was auch ich für wahrscheinlich halten möchte.

Für *Nosema bombycis* hat, wie schon oben erwähnt, Stempell angegeben, daß der Amöboidkeim der fertigen Spore einkernig ist, dann durch amitotische Teilung

[1]) Bei diesen Präparaten hatte das Protoplasma, das sonst in der Regel blau gefärbt erscheint, eine mehr rotviolette oder rote Färbung angenommen.

zwei Kerne erhält und nach Aufnahme der Spore in einen neuen Wirt durch wiederholte Kernteilung vierkernig wird. Diese vier Kerne werden alle als in dem Protoplasmaring liegend angegeben. Wenn man von dem letzteren Falle absieht, über den ich nichts aussagen kann, da mir Beobachtungen über die Zahl der Kerne nach Aufnahme der Spore in den neuen Wirt nicht vorliegen, so stimmen meine Beobachtungen bezüglich der Kerne in den Sporen mit denen Stempells im wesentlichen überein. Meine Figuren 27—30, 34—37, 43 und 31—33, 38—41, 44—45 stehen auch mit den Figuren 72 und 82 bezw. 81, 83, 84, 94 und 95 im allgemeinen in gutem Einklang. Ob Stempells Figuren 90—93 in gleichem Sinne gedeutet werden müssen, wie die bisher genannten Figuren von ihm und mir, ist mir nicht ganz sicher, da die hier als Kerne in Anspruch genommenen Gebilde erheblich größer erscheinen als die Kerne, die ich sah, und wie sie Stempell in den Figuren 72, 94 und 95, die mit seinen eigenen am besten übereinstimmen, abgebildet hat. Nicht einverstanden bin ich jedoch mit der Deutung, welche Stempell den in seinen Figuren 70, 71, 73, 80, 83 als Kerne aufgefaßten Gebilden gibt, und welche er zum Teil für Schalen- und Polkapselkerne hält. Ich bin vielmehr der Meinung, daß diese Gebilde keine Kerne, sondern „metachromatische Körner" sind. Hierfür spricht, daß in den betreffenden Sporen die Bildung der Vacuolen schon mehr oder weniger weit vorgeschritten und das Protoplasma zum Teil sogar schon auf die Ringzone beschränkt ist, und daß diese Gebilde nicht im Protoplasma, sondern frei im Vacuolenhohlraum liegen. Damit fallen die wesentlichen Stützen für die Annahme, daß bei *Nosema bombycis* Schalen- und Polkapselzellen vorhanden seien.

Eine ziemlich große Übereinstimmung zeigen die reifen Sporen von *Nosema bombycis* betr. der Kerne mit denen von *Thelohania chaetogastris*. Für die reifen Sporen dieser Form beschreibt Schröder ebenfalls ein oder zwei Kerne, die stets deutlich im Protoplasmaring liegen.

In welchem Verhältnis die ein- und zweikernigen Stadien zueinander stehen, bedarf noch genauerer Untersuchung. Hier bestehen mehrere Möglichkeiten. Zunächst könnte ein zweikerniges Sporoblastenstadium vorhanden sein und die Einkernigkeit das Ergebnis einer Verschmelzung zweier in die Spore übernommener Kerne sein. Dies ist mir wenig wahrscheinlich. Meine Beobachtungen über eigentliche, mit Sicherheit als Sporoblasten aufzufassende Stadien sind leider lückenhaft. Immerhin ist in Fig. 25 eine unreife Spore wiedergegeben, bei welcher erst die hintere Vacuole sich zu bilden begonnen hat und das Protoplasma noch nicht bis auf die Ringzone zusammengezogen ist. Diese unreife Spore besitzt nur einen Kern. Ebenso konnte Schuberg bei den sehr großen Sporoblasten und Sporen von *Plistophora multifilis*, bei denen die Kernverhältnisse besser zu untersuchen sind, stets nur einen Kern auffinden. Ich halte es daher für ausgeschlossen, daß die Einkernigkeit durch Verschmelzung zweier, aus dem Sporoblastenstadium übernommener Kerne erreicht wird, wie dies Schröder für die Sporen von *Thelohania chaetogastris* für möglich hält. Ebenso spricht nichts dafür, daß etwa eine Copulation der Sporenbildung vorhergegangen sein könnte. Es bleibt daher nur die dritte Möglichkeit, daß die zwei Kerne durch Teilung eines ursprünglich in der Einzahl vorhandenen Kernes entstanden

sind, daß also die zweikernigen Sporen spätere Stadien darstellen als die einkernigen. Dies entspricht, wie oben erwähnt, auch der Ansicht Stempells. Nach ihm soll die Teilung amitotisch sein. Ich selbst konnte nicht feststellen, auf welche Weise die Kernteilung erfolgt.

Meine Ansicht geht also, wie ich zusammenfassend bemerken möchte, dahin, daß die Sporen aus dem Sporoblastenstadium nur den in diesem in der Einzahl vorhandenen Kern übernehmen, und daß in der reifen Spore eine Vermehrung des Kernes in zwei eintritt. Die einkernigen Sporoblasten entstehen direkt durch Weiterentwicklung der einkernigen Endstadien der Schizogonie.

Literatur.

1910a. Auerbach, M., Die Cnidosporidien. Leipzig.

1910b. Derselbe, Cnidosporidienstudien. In: Zool. Anz. Bd. XXXV.

1868. Balbiani, E. G., Rapport du Jury international de l'exposition universelle de 1867. T. XII. 1868, S. 429.

1884. Derselbe, Leçons sur les sporozoaires. Paris.

1909. Doflein, F., Lehrbuch der Protozoenkunde, 2. Aufl.

1904a. Hesse, E., Sur le développement de *Thelohania legeri* Hesse. In: C. R. Soc. Biol. Paris, T. 56.

1904b. Derselbe, *Thelohania legeri* n. sp., Microsporidie nouvelle, parasite des larves d'*Anopheles maculipennis*. In: C. R. Soc. Biol. Paris, T. 56.

1907. Léger, L. et Hesse, E., Sur une nouvelle Myxosporidie parasite de la sardine. In: C. R. Ac. Sc., Paris T. 145.

1908. Mercier, L., Sur le développement et la structure des spores de *Thelohania giardi* Henneguy. In: C. R. Ac. Sc. Paris, T. 146.

1905. Pérez, Ch., Microsporidies parasites des Crabes d'Arcachon (Note préliminaire). In: Trav. Lab. Soc. scient. Arcachon. Ann. 8.

1909. Schröder, O., *Thelohania chaetogastris*, eine neue in *Chaetogaster diaphanus* Gruith. schmarotzende Microsporidienart. In: Arch. f. Protistenkunde. Bd. 14.

1909. Schuberg, A., Über die Färbung von Schnittpräparaten mit der Giemsaschen Azur-Eosin-Methode. In: Deutsche Mediz. Wochenschr. 1909. II.

1910. Derselbe, Über Microsporidien aus dem Hoden der Barbe und durch sie verursachte Hypertrophie der Kerne. In: Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte Bd. 33.

1902. Stempell, W., Über *Thelohania mülleri* (L. Pfr.). In: Zool. Jahrb. Abt. f. Anat. Bd. 16.

1904. Derselbe, Über *Nosema anomalum* Monz. In: Arch. f. Protistenkunde Bd. 4.

1907. Derselbe, Die Pébrinekrankheit der Seidenraupe. In: Sitzungsber. naturhist. Ver. preuß. Rheinl.-Westfalen 1907.

1909a. Derselbe, Über die Entwicklung von *Nosema bombycis* Nägeli. In: Zoolog. Anz. Bd. 34.

1909b. Derselbe, Über *Nosema bombycis* Nägeli. In: Arch. f. Protistenkunde Bd. 16.

1910. Derselbe, Zur Morphologie der Microsporidien. In: Zoolog. Anz. Bd. 35.

Figurenerklärung.

Sämtliche Figuren mit Ausnahme von Fig. 19—23 sind nach Paraffinschnitten gezeichnet. Fig. 1—10, 24—25, 27—42 stammen von Material, das mit Sublimat-Eisessig, Fig. 11—17, 26, 43—45 von solchem, das mit Sublimat-Alkohol fixiert war.

Zur Färbung diente für die Präparate von Fig. 1—18 und 24—42 Giemsalösung, für Fig. 43—45 Eisenhämatoxylin nach Heidenhain.

Sämtliche Figuren wurden mit Hilfe eines Zeißschen Mikroskops unter Benutzung des Zeichenapparats angefertigt.

Fig. 1—10. Stadien aus der Länge nach durchschnittenen Muskelfasern des Darmkanals. Künstliche Infektion; 3. Tag (Fig. 1—8) und 4. Tag (Fig. 9 und 10). Apochr. 2 mm, Comp. Oc. 8.

Fig. 11—18. Stadien aus quergeschnittenen Muskelfasern des Darmkanals Natürliche Infektion. Apochr. 2 mm, Comp. Oc. 12.

Fig. 19—23. Reife Sporen aus einem getrockneten Schmetterling. Apochr. 2 mm, Comp. Oc. 12.

Fig. 24—25. Sporoblasten. Apochr. 2 mm, Comp. Oc. 12.

Fig. 26. Reife Sporen in quergeschnittener Muskelfaser. Apochr. 2 mm, Comp. Oc. 12.

Fig. 27—40. Sporen. Natürliche Infektion. Apochr. 2 mm, Comp. Oc. 12.

Fig. 41—42. Sporen aus Zellen des Darmepithels. Künstliche Infektion. 4. Tag. Apochr. 2 mm, Comp. Oc. 12.

Fig. 43—45. Sporen. Färbung mit Eisenhämatoxylin nach Heidenhain. Apochr. 2 mm Comp. Oc. 12.

Ende des 1. Heftes.

Abgeschlossen am 10. Mai 1912.

Experimentelle Untersuchungen über das Gift der Larve von Diamphidia simplex Péringuey (Diamphidia locusta Fairmaire).

Von

Professor **Dr. L. Haendel,**
Regierungsrat im Kaiserlichen Gesundheitsamte

und

Stabsarzt **Dr. E. Gildemeister,**
kommandiert zum Kaiserlichen Gesundheitsamte.

(Hierzu Tafel III.)

Anfang des Jahres 1911 war dem Kaiserlichen Gesundheitsamt durch das Reichs-Kolonialamt eine Sendung des Kaiserlichen Bezirksamtes Grootfontain, bestehend aus Käfern, Larven und Puppen, zur Untersuchung überwiesen worden. Die Käfer und Larven stammten aus der Umgebung von Ojituo und Karakowisa. Die Buschleute im Sandfelde und der Kalahari sollen diese Käferart zum Vergiften ihrer Pfeile verwenden. Daß die Kalaharibuschleute zum Vergiften ihrer Pfeile auch tierische, von Käfern oder deren Larven stammende Gifte benutzen, ist schon sehr lange bekannt. So wird darauf bereits in dem Ende des 18. Jahrhunderts erschienenen Reisebericht von St. Vaillant (1), ferner von Baines (2), sowie von Livingstone (3) hingewiesen. Livingstone berichtet, daß er Buschmänner des nördlichen Teiles der Kalahari die Eingeweide einer kleinen Raupe, welche „Nga" genannt wurde, als Pfeilgift habe verwenden sehen.

Die ersten näheren Mitteilungen über die fragliche Käferart in späterer Zeit verdanken wir Schinz. In seinem Reisewerk Deutsch-Südwestafrika (4) hat er zunächst über die Verwenpung einer Käferart als Pfeilgift seitens der Buschmänner berichtet. Genauere Angaben machte er dann in einer vorläufigen Mitteilung „Über das Pfeilgift der Kalichari-San" (5), nachdem ihm und Lewin (6) eine ausreichende Menge der betreffenden Käferart durch Fleck zugesandt war, welche die zoologische Bestimmung des Käfers durch Fairmaire, sowie die experimentelle Untersuchung des Giftes durch Boehm, Starcke und durch Lewin (6) ermöglichte. Fairmaire (5) beschrieb den Käfer als neue Spezies unter dem Namen „Diamphidia locusta Fairmaire", während Kolbe (6), welcher von Lewin den Käfer ebenfalls zur Bestimmung erhalten hatte, feststellte, daß es sich um die schon bekannte Käferart „Diamphidia simplex Péringuey" handelte[1]).

[1]) Vergl. auch Taschenberg, Die giftigen Tiere, S. 283, 1909, Ferdinand Enke, Stuttgart.

Das Vorkommen des Käfers ist nach Schinz an eine bestimmte Wirtspflanze, einen in Afrika weit verbreiteten Halbstrauch „Commiphora africana“ gebunden, Larve und Käfer werden nur in unmittelbarer Nähe dieses Busches gefunden. Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung des Giftes liegen, wie erwähnt, von Boehm (7), Lewin (6) und Starcke (8) vor. Nach den Untersuchungen von Boehm und Starcke, über deren Ergebnisse diese Autoren später in besonderen Arbeiten berichtet haben, enthalten nur die Larven von Diamphidia locusta ein durch Kochsalzlösung oder durch Wasser leicht extrahierbares Gift, während die Puppenschalen und Käfer ungiftig sind. In natürlich getrockneten Larven bleibt das Gift lange gut wirksam erhalten. Das Gift der Larven wirkt als Blutgift, verursacht im Reagenzglase und im Tierkörper den Austritt des Hämoglobins aus den roten Blutzellen und ruft bei subkutaner Einspritzung bei den Versuchstieren eine von der Injektionsstelle ausgehende, schwere, fortschreitende, nekrotisierende Entzündung hervor. Bei subkutaner oder intravenöser Einspritzung entsprechender Dosen tötet es Säugetiere und Vögel. Ein Unterschied in der Wirkung des Giftes je nach subkutaner oder intravenöser Einverleibung ließ sich bei diesen Versuchen nicht feststellen. Die Giftwirkung machte sich auch bei der Zuführung des Giftes in die Blutbahn ebenso wie bei subkutaner Anwendung nicht sofort, sondern erst nach einiger Zeit bemerkbar. Als erste Erscheinung der Vergiftung wurde bei den Versuchstieren Mattigkeit und Schwäche beobachtet, später traten Entleerung blutigen Harns, Lähmungen und Krämpfe auf. Bei Einführung auf dem Verdauungswege übte das Gift bei Vögeln (Hühnern und Tauben) keine Wirkung aus. Genauere quantitative Untersuchungen über die Wirksamkeit des Giftes gegenüber verschiedenen Tierarten liegen nicht vor. Doch hatte Starcke bereits festgestellt, daß die Larvenextrakte für Frösche zwar ebenfalls giftig sind, daß ihre Wirkung auf den Kaltblüterorganismus aber wesentlich schwächer ist. Durch Kochen wird das Gift unwirksam gemacht. Das Gift gehört nach der Ansicht der Autoren zur Gruppe der Toxalbumine. Lewin (6) hält das Gift ebenfalls für ein Toxalbumin. Die Ergebnisse seiner Untersuchungen weichen aber insofern von denen der vorgenannten Autoren ab, als nach seinen Angaben sich auch die zerstampften, ganzen Käfer toxikologisch wie die Larven verhalten. Nach subkutaner Einspritzung eines wässerigen Auszuges der Erdkokons traten dagegen bei 2 Kaninchen keine typischen Vergiftungserscheinungen auf, doch starben die Tiere nach 24 Stunden. Auf Frösche hatte das Gift nach den Beobachtungen Lewins keine Wirkung.

Im Jahre 1907 hatte dann Heubner (9) Gelegenheit, das Gift einiger Pfeile von Buschmännern der Wüste Kalahari aus der Gegend zwischen Gobabis und Rietfontein zu untersuchen. Er kam auf Grund seiner Versuche zu dem Ergebnis, daß das von ihm untersuchte Gift mit dem von Boehm, von Lewin und Starcke beschriebenen Larvengifte identisch sei. Im Gegensatz zu der Annahme der genannten Autoren ist aber nach seiner Auffassung die wirksame Substanz des Giftes nicht eiweißartiger Natur, da es ihm nach seinen Angaben gelang, auf folgende Weise ein von Eiweiß und Salzen getrenntes Gift zu erhalten.

Die bröckelige Masse, aus der die Pfeilüberzüge bestanden, löste sich zum Teil in Wasser. Die giftige wässerige Lösung eines Pfeilüberzuges enthielt 0,15—0,5 g Trockensubstanz. Die giftige

Substanz ließ sich durch Eintropfen einer bei niederer Temperatur konzentrierten Lösung in die 20- bis 30 fache Menge absoluten Alkohols vollständig ausfällen. Der durch Alkohol erzeugte Niederschlag löste sich nach dem Trocknen restlos mit neutraler Reaktion in Wasser und tötete Kaninchen bei intravenöser Einspritzung in einer Dosis von 5 mg pro kg Tier binnen 2—3 Stunden. Die sehr stark konzentrierte, wässerige Lösung des Alkoholniederschlages wurde mit geringen Mengen 33 % iger Metaphosphorsäure versetzt. Es entstand eine Opaleszenz und erst nach Sättigen mit festem Kochsalz eine abfiltrierbare Trübung. Die sofort filtrierte Lösung war noch opaleszent und wurde sofort mit Sodalösung genau neutralisiert und bei kühler Temperatur gegen fließendes, zuletzt destilliertes Wasser dialysiert. Die erschöpfend dialysierte Lösung war farblos, wasserhell und hinterließ beim Eintrocknen im Exsikkator ein weißes amorphes Pulver, von welchem 1,8 mg pro Tier ein Kaninchen innerhalb drei Stunden tötete. Die Substanz gab weder Biuret- noch Millonsche Reaktion. Da die Fällung mit Alkohol bereits eine Schädigung der wirksamen Substanz bedingt, so führte die benutzte Isolierungsmethode nur unter großen Verlusten zum Ziel.

Die von Heubner mit dem auf diese Weise gewonnenen Gifte angestellten experimentellen Versuche führten in der Tat in verschiedener Hinsicht zu entsprechenden Ergebnissen, wie sie namentlich auch Starcke bei seinen Untersuchungen mit dem Larvengift von Diamphidia locusta erhalten hatte. Allerdings bestehen auch Abweichungen; so bewirkte das Heubnersche Gift beim Einträufeln in die Kaninchencornea keine Entzündung, und ferner muß es als auffallend bezeichnet werden, daß Heubner in einem Falle die hämolytische Wirksamkeit einer Lösung des Giftes auch nach dem Kochen unverändert fand.

In neuester Zeit endlich hat dann Trommsdorf (10) über einige experimentelle Untersuchungen über eine von Buschleuten zum Vergiften der Pfeilspitze benutzte Käferlarve berichtet. Trommsdorf nimmt an, es mit einer bisher unbekannten Käferart zu tun zu haben. Nach dem Inhalt der Mitteilung und den ihr beigegebenen Abbildungen dürfte es sich jedoch auch bei diesen Untersuchungen ebenfalls um Larven von Diamphidia locusta gehandelt haben.

Die dem Gesundheitsamt überwiesene Sendung bestand, wie erwähnt, aus Käfern, Larven und Puppen (vergl. die Abbildungen auf der beigegebenen Tafel). Einzelne Exemplare der Käfer und der Larven lebten noch bei der Ankunft. Die zoologische Bestimmung durch Herrn Regierungsrat Prof. Dr. Schuberg ergab, daß es sich um Käfer, Larven und Puppen von Diamphidia simplex Péringuey (Synonym mit Diamphidia locusta Fairmaire) handelte. Die Larven hatten eine Länge von ca. 1—$1^1/_2$ cm. Ihre Färbung war gelbrosa bis fleischfarben, der Kopf schwarz. Die noch lebend angekommenen Käfer und Larven ließen sich nicht lange am Leben erhalten, sie gingen bald nach der Ankunft ebenfalls zugrunde. Die toten Larven trockneten rasch ein und schrumpften außerordentlich stark zusammen, sie zeigten dann etwa das Aussehen einer kleinen, getrockneten Wachholderbeere. Ein großer Teil der Larven war leider vor der Absendung in Grootfontain durch länger dauernde Erhitzung abgetötet worden, um die Weiterentwicklung der Larven zu verhindern. Wie es sich bei der Aufnahme der Untersuchungen zeigte, war aber dadurch auch die Giftigkeit dieser Larven zerstört worden, sodaß nur noch ein kleiner Teil des erhaltenen Materials für weitere Versuche brauchbar war. Die noch vorhandenen verwertbaren Larven konnten aber doch zur Ausführung einiger experimenteller Versuche benutzt werden, über deren Ergebnisse nachstehend berichtet werden soll.

Wirkung des Giftes auf rote Blutkörperchen und andere Zellen.

Zur Giftgewinnung aus den Larven eignet sich am besten das schon von Boehm und Starcke empfohlene Verfahren der einfachen Mazeration der unzerkleinerten Larven in einer bestimmten Menge von Flüssigkeit. Wir hatten den Eindruck, daß die Giftauslaugung mit Kochsalzlösung besser gelingt, wie mit destilliertem Wasser, während nach den Beobachtungen Boehms sich durch Salzlösungen nicht mehr Gift extrahieren läßt als durch Wasser. Groß sind die Unterschiede allerdings nicht, da uns aber Kochsalzlösung auch aus anderen Gründen als Extraktionsmittel erwünscht war, so haben wir sie regelmäßig benutzt. Im allgemeinen sind wir, um einigermaßen quantitativ vergleichbare Untersuchungen ausführen zu können, in der Weise vorgegangen, daß wir immer 1 Larve mit 1 ccm Kochsalzlösung während 24 Stunden bei Eisschranktemperatur auslaugten. Die eingetrockneten Larven quellen in der Flüssigkeit wieder stark auf und bekommen zum Teil ein etwas durchscheinendes, glasartiges Aussehen. Die Extraktionsflüssigkeit reagiert leicht sauer. Auf diese Weise haben wir aus getrockneten, wie auch aus lebenden Larven jeweils ziemlich gleich wirksame Giftextrakte erhalten. Die Stärke der einzelnen Extrakte war natürlich nicht in jedem Falle absolut gleich, doch waren die beobachteten Schwankungen im allgemeinen nur gering. Die Stärke der Giftigkeit der einzelnen gewonnenen Extrakte wurde zunächst nach ihrer hämolytischen Wirkung auf eine 5%ige Hammelblutkörperchen- oder Meerschweinchenblutkörperchenaufschwemmung verglichen. In der Regel wurde 1 ccm einer derartigen Blutkörperchenaufschwemmung innerhalb von 20 Stunden durch 0,0001 ccm eines in der angegebenen Weise gewonnenen Larvenextraktes komplett oder fast komplett gelöst. War die Blutkörperchenaufschwemmung schwächer, z. B. nur 2,5%, so verlief die Hämolyse erheblich schneller. Die Tabelle 1 gibt ein Protokoll, aus dem die Wirkung eines aus einer getrockneten Larve gewonnenen Giftextraktes auf eine 2,5%ige Meerschweinchenblutkörperchenaufschwemmung ersichtlich ist.

Tabelle 1. Hämolytische Wirkung des aus einer an der Luft getrockneten Larve gewonnenen Giftes auf Meerschweinchenblutkörperchen.

Menge des Giftextraktes	Menge der 2,5%igen Blutaufschwemmung	Beobachtung nach einer Bebrütung von:		
		10 Minuten	30 Minuten	18 Stunden
0,1 ccm	1 ccm	komplett	komplett	komplett
0,03 „	1 „	„	„	„
0,02 „	1 „	„	„	„
0,01 „	1 „	„	„	„
0,001 „	1 „	0	„	„
0,0001 „	1 „	0	fast komplett	„
0,00001 „	1 „	0	Spur	fast komplett

Bei dem vorstehenden Versuch vermochte 0,0001 ccm des Giftextraktes 1 ccm einer 2,5%igen Meerschweinchenblutkörperchenaufschwemmung bereits innerhalb 30 Min. fast komplett aufzulösen, nach 18 Stunden hatte sogar die 10fach geringere Giftmenge nämlich 0,00001 ccm Giftextrakt 1 ccm der Blutaufschwemmung fast komplett gelöst.

Das in Tabelle 2 wiedergegebene Protokoll enthält einen an demselben Tage unter Verwendung der gleichen Blutkörperchenaufschwemmung ausgeführten Versuch mit einem aus einer lebenden Larve gewonnenen Giftextrakte.

Tabelle 2. Hämolytische Wirkung des aus einer lebenden Larve gewonnenen Giftes auf Meerschweinchenblutkörperchen.

Menge des Giftextraktes	Menge der 2,5 %igen Blutaufschwemmung	Beobachtung nach einer Bebrütungsdauer von:		
		10 Minuten	30 Minuten	18 Stunden
0,1 ccm	1 ccm	komplett	komplett	komplett
0,03 „	1 „	„	„	„
0,02 „	1 „	„	„	„
0,01 „	1 „	„	„	„
0,001 „	1 „	0	„	„
0,000 1 „	1 „	0	fast komplett	„
0,000 01 „	1 „	0	Spur	fast komplett

Der Versuch zeigt, daß sich auch aus der lebenden Larve durch einfache Mazeration mit Kochsalzlösung ein hinsichtlich seiner hämolytischen Wirkung auf Meerschweinchenblutkörperchen gleich wirksamer Giftextrakt gewinnen läßt wie aus einer natürlich getrockneten Larve. Der hämolytische Titer des aus der lebenden Larve erhaltenen Giftauszuges stimmt mit dem des im ersten Versuch verwerteten Extraktes vollständig überein.

Die Wirkung der einzelnen Giftextrakte erwies sich nun bei vergleichenden Versuchen gegenüber den verschiedenartigsten, bei den Untersuchungen benutzten Säugetierblutarten ziemlich gleich, bei allen Blutarten lag die kleinste Giftdosis, welche noch 1 ccm einer 5%igen Aufschwemmung der roten Blutzellen in Kochsalzlösung komplett oder fast komplett löste, etwa bei 0,0001 ccm. Dagegen erwiesen sich die roten Blutkörperchen von Vögeln und Fischen dem Gift gegenüber ganz erheblich viel widerstandsfähiger als die der Säugetiere.

Tabelle 3 (S. 128) enthält das Protokoll eines derartigen Versuches, bei welchem ein Larvengiftextrakt gegen verschiedene Säugetier- sowie zwei Vogel- und eine Fischblutart ausgewertet wurde.

Aus diesem Versuch ist die größere Widerstandsfähigkeit des in Kochsalz aufgeschwemmten Vogel- und Fischblutes dem Gift gegenüber deutlich ersichtlich. Während 0,0001 ccm der Giftlösung 1 ccm einer 5%igen Blutkörperchenkochsalzaufschwemmung der verschiedenen Säugetierblutarten fast komplett zur Lösung zu bringen vermag, wird z. B. 1 ccm einer 5%igen Blutkörperchenkochsalzaufschwemmung von der Taube oder vom Huhn selbst durch 0,1 ccm Giftextrakt nicht völlig gelöst. Ebenso wird auch 1 ccm Blut vom Karpfen durch eine entsprechende hohe Giftdosis nicht zur völligen Lösung gebracht.

Ganz verschieden ist nun aber auch den Säugetierblutkörperchen gegenüber die blutlösende Wirkung des Giftes, wenn die Blutkörperchen statt in Kochsalzlösung in einem kochsalzfreien Medium, z. B. in isotonischer Rohrzuckerlösung, aufgeschwemmt werden. Aus Tabelle 4 (S. 129) ist dies ohne weiteres ersichtlich.

Tabelle 3. Prüfung der hämolytischen Wirkung des Giftes an verschiedenen Blutarten.

Blut und Gift in isotonischer Kochsalzlösung.

1 ccm einer 5 %igen Blutaufschwemmung von folgenden Tierarten	Dauer der Bebrütung bei 37 °	Larvengiftextraktmengen mit 0,85 %iger Kochsalzlösung auf 1 ccm aufgefüllt				
		0,1 ccm	0,01 ccm	0,001 ccm	0,000 1 ccm	0,000 01 ccm
Hammel	2 Stunden	komplett	komplett	komplett	stark	0
	20 „	„	„	„	fast komplett	0
Ziege	2 Stunden	komplett	komplett	fast komplett	fast komplett	0
	20 „	„	„	komplett	„ „	0
Rind	2 Stunden	komplett	komplett	komplett	fast komplett	0
	20 „	„	„	„	„ „	0
Ratte	2 Stunden	komplett	komplett	fast komplett	fast komplett	0
	20 „	„	„	„ „	„ „	0
Kaninchen	2 Stunden	komplett	komplett	komplett	stark	0
	20 „	„	„	„	fast komplett	mäßig
Meerschweinchen	2 Stunden	komplett	komplett	fast komplett	fast komplett	0
	20 „	„	„	„ „	„ „	Spur
Huhn	2 Stunden	Spur	Spürchen	0	0	0
	20 „	mäßig	Spur	Spur	0	0
Taube	2 Stunden	Spur	Spürchen	Spürchen	0	0
	20 „	stark	mäßig	mäßig	Spur	0
Karpfen	2 Stunden	0	0	0	0	0
	20 „	inkomplett	mäßig	mäßig	mäßig	0

Wir sehen aus dem nebenstehenden Versuch, daß den in isotonischer Rohrzuckerlösung aufgeschwemmten Blutkörperchen der verschiedenen Säugetierblutarten gegenüber die hämolytische Wirkung des Giftes ganz erheblich viel schwächer ist, und daß auch zeitlich die Hämolyse viel langsamer verläuft. Auf das Hühnerblut wirkt das Gift bei diesem Versuch in der großen Dosis von 0,1 ccm etwas stärker hämolytisch, in den Abstufungen aber ebenfalls schwächer ein. Auf das Taubenblut hatte das Gift nach 20 Stunden etwa dieselbe Wirkung wie auf die in Kochsalzlösung aufgeschwemmten Blutkörperchen dieser Vogelart (Tabelle 3), nach 2 Stunden war aber bei den in Rohrzuckerlösung aufgeschwemmten Taubenblutkörperchen noch keine Hämolyse zu bemerken. Es ist nicht ausgeschlossen, daß die Blutkörperchen durch die in diesem Falle eingetretene, außerordentlich und auffallend starke Agglutination vor der Hämolyse zunächst geschützt waren. Eine derartige, starke Agglutination der in Rohrzuckerlösung aufgeschwemmten Taubenblutkörperchen durch abgestufte Mengen von Giftextrakt haben wir auch noch in einem anderen Versuch, dessen Protokoll nicht ausführlich wiedergegeben ist, beobachtet. Besonders hinzuweisen ist endlich noch auf die bei diesem Versuch in Erscheinung getretene Tatsache, daß die Fischblutkörperchen

Tabelle 4. Prüfung der hämolytischen Wirkung des Giftes an verschiedenen Blutarten.

Blut und Gift in isotonischer Rohrzuckerlösung.

1 ccm einer 5 %igen Blutaufschwemmung von folgenden Tierarten	Dauer der Bebrütung bei 37°	Larvengiftextraktmengen mit isotonischer Rohrzuckerlösung auf 1 ccm aufgefüllt				
		0,1 ccm	0,01 ccm	0,001 ccm	0,000 1 ccm	0,000 01 ccm
Hammel	2 Stunden	—	Spur	0	0	0
	20 „	—	mäßig	Spur	0	0
Ziege	2 Stunden	—	0	0	0	0
	20 „	—	mäßig	0	0	0
Rind	2 Stunden	—	0	0	0	0
	20 „	—	Spur	Spur	Spur	Spur
Ratte	2 Stunden	—	0	0	0	0
	20 „	—	Spur	Spur	Spur	Spur
Kaninchen	2 Stunden	—	Spur	0	0	0
	20 „	—	komplett	komplett	stark	Spur
Meerschweinchen	2 Stunden	—	mäßig	0	0	0
	20 „	—	stark	mäßig	mäßig	Spur
Huhn	2 Stunden	fast komplett	0	0	0	0
	20 „	„ „	0	0	0	0
Taube	2 Stunden	starke Agglutination	Agglutination	Agglutination	Agglutination	0
	20 „	stark	mäßig	mäßig	Spur	0
Karpfen	2 Stunden	fast komplett	fast komplett	fast komplett	mäßig	0
	20 „	„ „	„ „	„ „	„	0

in kochsalzfreiem Medium sich dem Gift gegenüber ganz erheblich viel fragiler erwiesen als in isotonischer Kochsalzaufschwemmung. Wodurch der Austritt des Hämoglobins bedingt wird, insbesondere an welchen Stoffen der Blutkörperchen das Gift angreift, ließ sich nicht feststellen. Die Blutkörperchen wurden jedenfalls in keinem Fall restlos aufgelöst, sondern immer waren die Blutkörperchen-Schatten erhalten und ließen sich sowohl in flüssiger Tusche wie mittels Methylvioletts gut sichtbar machen. Wurden abgestufte Giftmengen im Reagenzglase mit Lezithin, Cholestearin, Eiweiß oder Eigelb zusammengebracht, so konnte selbst bei länger dauernder Beobachtung keinerlei Wirkung des Giftes auf diese Stoffe bemerkt werden. Außer auf rote Blutkörperchen übte das Gift auch auf andere Zellen eine schädigende Wirkung aus. Weiße Blutkörperchen wurden schon durch verhältnismäßig schwache Giftlösungen rasch abgetötet, sie wurden unbeweglich und bekamen ein glasiges Aussehen. Eine völlige Auflösung wurde aber weder bei ihnen noch bei anderen Organzellen beobachtet. Verschiedene Bakterien wie Typhus, Paratyphus B, Colibazillen ließen auch in starken Giftlösungen keine Schädigung erkennen und zeigten lange gute Beweglichkeit, ebenso Vibrionen. Auch Trypanosomen und Hühnerspirochaeten besaßen selbst ziemlich

konzentrierten Giftlösungen gegenüber ziemliche Resistenz. Dagegen erscheint es bemerkenswert, daß Meerschweinchenspermatozoen durch das Gift rasch abgetötet wurden.

Wirkung des Giftes auf Versuchstiere.

Von Boehm und Starcke sind zu ihren Tierversuchen verhältnismäßig recht große Dosen des Giftes benutzt worden. Nach Boehm betrug die kleinste für Kaninchen tödliche Giftmenge 0,25 ccm einer Giftlösung, welche durch 24stündige Mazeration einer Larve in 1 ccm Wasser gewonnen war. In der Anwendung so hoher Dosen liegt vielleicht mit die Erklärung, daß diese Autoren keine auffallenderen Unterschiede in der Wirkung des Giftes auf die Versuchstiere je nach dessen subkutaner oder intravenöser Zuführung gesehen haben. Bei unseren Versuchen über die Wirkung des Giftes am lebenden Tiere ergab es sich bei Benutzung genau abgestufter Giftmengen in eindeutiger Weise, daß das Gift bei unmittelbarer Einführung in die Blutbahn doch ganz erheblich rascher wirkt und die Versuchstiere viel schneller tötet als bei Einspritzung des Giftextraktes in das Unterhautzellgewebe. Aus dem Protokoll des nachstehenden Versuches sind die für Kaninchen und Meerschweinchen bei subkutaner und intravenöser Giftzuführung wirksamen Giftdosen ersichtlich.

Tabelle 5.

a) Kaninchen.

Nr.	Gewicht kg	Menge des Giftextrakts ccm	Anwendungsart	Ausgang
70	1,000	0,6	subkutan am Rücken	† innerhalb 24 Stunden
75	0,850	0,15	„ „ Ohr	† „ 24 „
74	0,860	0,1	intravenös	† „ 2 Minuten
1	2,300	0,05	„	† „ 15 „
2	2,200	0,01	„	† „ 24 Stunden
78	1,900	0,005	„	† „ 24 „
79	1,900	0,005	„	† „ 48 „
3	2,300	0,001	„	lebt
			b) Meerschweinchen.	
72	380 g	0,4	subkutan	† innerhalb 24 Stunden
76	460 „	0,1	„	† „ 15 Tagen
77	270 „	0,1	intrakardial	† „ 2 Minuten
1	350 „	0,05	„	† „ 4 „
2	380 „	0,01	„	† „ 50 „
3	360 „	0,005	„	† „ 24 Stunden

Bei unmittelbarer Zufuhr des Giftes in die Blutbahn genügte bei einem Kaninchen von 2,300 kg bereits 0,05 ccm, das Tier in 15 Minuten zu töten, während 0,6 ccm desselben Giftextraktes nach subkutaner Einspritzung bei einem Kaninchen von 1,000 kg erst nach 24 Stunden tödlich wirkte.

Auch Meerschweinchen wurden bei intravenöser Gifteinspritzung durch 0,05 ccm in wenigen Minuten, bei Einführung des Giftes in das Unterhautzellgewebe durch

0,4 ccm der Giftlösung aber erst nach 24 Stunden, durch 0,1 ccm des Giftes nach 15 Tagen getötet.

Bei intravenöser Behandlung machten die Tiere schon bald nach der Einspritzung des Giftes einen matten, schlaffen und kranken Eindruck, sie fielen nach einigen Minuten in der Regel auf die Seite, die Atmung wurde stark beschleunigt und mühsam, und die Tiere verendeten schließlich in der angegebenen Zeit unter heftigen Krämpfen.

Nach der subkutanen Einspritzung entwickelte sich bei den Tieren eine von der Injektionsstelle ausgehende, nekrotisierende Entzündung, die in weiter Ausdehnung zu völliger Gewebszerstörung führen kann. Während man den Tieren in der ersten Zeit nach der subkutanen Injektion nichts weiter anmerkte, machten sie später dann auch einen schlaffen und matten Eindruck, fraßen nicht und entleerten nach einigen Stunden blutigen Harn und blutigen Stuhl. Bei der Obduktion der verendeten Tiere fand sich regelmäßig eine schwere hämorrhagische Nierenentzündung. In der Blase noch vorhandener Harn war immer blutrot gefärbt und stark bluthaltig. Bei der mikroskopischen Untersuchung fanden sich in demselben zahlreiche Blutkörperchenzylinder und massenhafte mehr oder weniger stark veränderte, zum Teil in großen Schollen zusammenliegende rote Blutkörperchen. Der abzentrifugierte blutige Harn erwies sich für andere Versuchstiere ebenfalls giftig, dagegen wirkte er auf frische Blutkörperchen nicht hämolytisch.

Versuch a.

Prüfung des Harns eines vergifteten Tieres auf Giftigkeit.

Bei der Obduktion eines auf 0,15 ccm Giftextrakt subkutan nach 24 Stunden verendeten Kaninchens wird der aus der Blase gewonnene blutige Harn sorgfältig zentrifugiert. Es erhalten von dem sedimentfreien Harn:

Meerschweinchen 1 = 0,5 ccm intrakardial
Meerschweinchen 2 = 0,25 „ „
Meerschweinchen 3 = 0,1 „ „

Alle drei Tiere bekommen sofort nach der Einspritzung heftige Krämpfe.

Meerschweinchen 1 stirbt innerhalb 5 Sekunden
Meerschweinchen 2 stirbt innerhalb 15 Sekunden
Meerschweinchen 3 erholt sich allmählich wieder und überlebt.

Die Obduktion der Meerschweinchen 1 und 2 ergibt nichts Besonderes, bei beiden Tieren besteht keine Lungenstarre. Mit normalem Kaninchenharn gespritzte Kontrolltiere zeigten keine Erscheinungen.

Versuch b.

Prüfung des Harns eines vergifteten Tieres auf seine hämolytische Wirkung.

Menge des abzentrifugierten Harns	5 % ige Kaninchenblutkörperchenaufschwemmung	Ergebnis der Hämolyse nach 24 Stunden
1,0 ccm	1,0 ccm	0
0,5 „	1,0 „	0
0,3 „	1,0 „	0
0,2 „	1,0 „	0
0,1 „	1,0 „	0

Die Wirkung des Giftes auf Mäuse ist aus dem nachstehenden Protokoll ersichtlich.

Tabelle 6. Wirkung des Giftes auf Mäuse.

Maus Nr.	Gewicht g	Menge des Giftextrakts ccm	Anwendungsart	Ausgang
I	20	0,01	subkutan	† innerhalb 11 Minuten
II	20	0,005	„	† „ 22 „
III	20	0,0025	„	lebt
IV	20	0,0025	„	„

Darnach betrug die kleinste für Mäuse von 20 g tödliche Dosis des Larvengiftextraktes 0,005 ccm. Die mit dieser Giftmenge subkutan behandelten Tiere starben innerhalb 22 Minuten. 0,01 ccm derselben Giftlösung tötete bei subkutaner Zuführung Mäuse von ca. 20 g in 11 Minuten. Dagegen blieben die mit 0,0025 ccm subkutan behandelten Mäuse am Leben und zeigten auch keine ernsteren Krankheitserscheinungen.

Eine ganz beträchtlich stärkere Widerstandsfähigkeit dem Gift gegenüber zeigten nun Hühner, sowie Frösche und Fische.

Tabelle 7. Wirkung des Giftes auf Hühner.

Huhn Nr.	Gewicht g	Menge des Giftextrakts ccm	Anwendungsart	Ausgang
I	2300	0,1	intravenös	† nach 8 Stunden
II	2500	0,05	„	† innerhalb 24 Stunden
III	2300	0,01	„	lebt

Die hohe Giftdosis von 0,1 ccm vermochte bei diesen Versuchen ein Huhn selbst bei intravenöser Einspritzung des Giftes erst nach 8 Stunden, 0,05 ccm Giftlösung ein gleichschweres Tier erst innerhalb 24 Stunden zu töten. Während der ersten Stunden nach der Giftinjektion war den Tieren nichts anzusehen, erst nach 3 bezw. 6 Stunden machten sie den unbehandelten Kontrollhühnern gegenüber einen weniger munteren Eindruck und verhielten sich auffallend ruhig. Später blieben die vergifteten Hühner immer in sitzender Stellung, bis sie dann kurz vor dem Tode zur Seite fielen und ebenfalls unter Krämpfen verendeten. Ein drittes mit 0,01 ccm Giftextrakt intravenös behandeltes Tier blieb vollkommen munter und zeigte überhaupt keine Erscheinungen. Zu demselben Ergebnisse führte ein weiterer Versuch, bei dem zum Vergleich Hühner und Kaninchen mit gleichen Dosen desselben Giftextraktes behandelt worden waren.

Tabelle 8.

Nr. des Tieres	Gewicht g	Menge des Giftextrakts ccm	Anwendungsart	Ergebnis
Huhn I	—	0,05	intravenös	† nach 24 Stunden
Kaninchen I	1 800	0,05	„	† „ 12 „
Huhn II	—	0,01	„	**lebt**
Kaninchen II	2 100	0,01	„	† innerhalb 24 Stunden
Huhn III	—	0,005	„	**lebt**
Kaninchen III	1 700	0,005	„	† nach 24 Stunden

Auch in diesem Falle erkrankten die mit 0,01 und 0,005 ccm Giftextrakt behandelten Hühner nicht, während die mit der gleichen Giftmenge gespritzten Kaninchen innerhalb 24 Stunden zugrunde gingen. Die Dosis von 0,05 ccm Giftextrakt tötete ein Huhn. Das Tier starb aber erst nach 24 Stunden, während das mit der gleichen Giftmenge behandelte Kaninchen bereits innerhalb 10 Minuten verendete.

Frösche und Karpfen vertrugen ebenfalls hohe Giftdosen (0,01 ccm) ohne Erscheinungen.

Über die lokale Wirkung des Giftes auf die Konjunktiva des Kaninchenauges gab nachstehender Versuch Aufschluß.

Versuch.

Ein Kaninchen von 2600 g erhält ins rechte Auge 1 Tropfen Giftextrakt eingeträufelt. Innerhalb $^1/_2$ Stunde schwellen die Lider stark an, und die Konjunktiva rötet sich intensiv. Die Entzündungserscheinungen nehmen später an Stärke noch weiter zu. Die Lider sind ganz außerordentlich geschwollen, das Auge wird krampfhaft geschlossen gehalten. Nach gewaltsamem Öffnen des Auges sieht man die Konjunktiva stark geschwollen und entzündet; es besteht reichliche Absonderung eines gelbweißen Sekretes, die Pupille des rechten Auges ist enger als die des linken Auges. Nach 24 Stunden sind die Erscheinungen beträchtlich zurückgegangen, doch besteht noch Sekretion sowie Rötung und Schwellung der Lider und der Konjunktiva. Die Pupillen sind gleich weit. Am 2. Tage ist das Auge wieder beinahe, am 3. Tage vollkommen reizlos. Das Tier, welches noch 6 Wochen in Beobachtung blieb, zeigte späterhin keinerlei Allgemeinerscheinungen und auch keine Veränderungen an dem behandelten Auge.

Haltbarkeit und Widerstandsfähigkeit des Giftes.

Von Boehm ist bereits bei Mitteilung seiner Versuchsergebnisse darauf aufmerksam gemacht worden, daß die Giftigkeit der Mazerationsflüssigkeit außerordentlich rasch abnimmt. Er hat dies damit erklärt, daß das Gift durch die in dem Larvenextrakt auftretende Bakterienentwicklung geschädigt und zersetzt wird. Er empfahl deshalb den Giftauszügen geringe Mengen von Chloroform zuzusetzen, um die Bakterienentwicklung zu verhindern und auf diese Weise die Giftlösungen einige Tage wirksam erhalten zu können. Wir haben ebenfalls die Beobachtung gemacht, daß das Gift durch das in der Mazerationsflüssigkeit auftretende Bakterienwachstum rasch geschädigt wird. Es empfiehlt sich daher nicht, die Larven länger als 24, höchstens 48 Stunden im Eisschrank auszulaugen, da bei länger dauernder Extraktion infolge der in dieser Zeit eintretenden Bakterienvermehrung keine stärkeren, sondern schwächere Giftextrakte gewonnen werden, wie das nachstehende Protokoll zeigt.

Tabelle 9.

Giftextrakt durch 24stündige Mazeration einer Larve gewonnen ccm	5 % ige Hammelblutkörperchenaufschwemmung ccm	Ergebnis der Hämolyse nach		Giftextrakt durch 5tägige Mazeratin einer Larve gewonnen ccm	5 %ige Hammelblutkörperchenaufschwemmung ccm	Ergebnis der Hämolyse nach	
		2 Stunden	20 Stunden			2 Stunden	20 Stunden
0,1	1,0	komplett	komplett	0,1	1,0	komplett	komplett
0,03	1,0	„	„	0,03	1,0	„	„
0,01	1,0	„	„	0,01	1,0	„	„
0,003	1,0	„	„	0,003	1,0	fast komplett	„
0,001	1,0	„	„	0,001	1,0	stark	fast komplett
0,000 3	1,0	fast komplett	„	0,000 3	1,0	Spur	mäßig
0,000 1	1,0	stark	„	0,000 1	1,0	0	0

Nach dem Ergebnis dieses Versuches ist der hämolytische Titer einer durch 24stündige Extraktion gewonnenen Giftlösung mindestens um das 10fache höher als der eines durch 5tägige Mazeration gewonnenen Giftauszuges. Entsprechende Differenzen machen sich geltend, wenn man das Ergebnis eines mit einem frischen 24stündigen Giftextrakt angestellten Hämolyseversuchs vergleicht mit der hämolytischen Wirkung desselben Extraktes nach einer 3- und 8tägigen Aufbewahrung bei Eisschranktemperatur.

Tabelle 10.

24stündiger Giftextrakt ccm	5 % ige Hammelblutkörperchenaufschwemmung ccm	Ergebnis der Hämolyse nach		3 Tage altes Giftextrakt ccm	Ergebnis der Hämolyse nach		8 Tage altes Giftextrakt ccm	Ergebnis der Hämolyse nach	
		2 Stunden	20 Stunden		2 Stunden	20 Stunden		2 Stunden	20 Stunden
0,1	1,0	komplett	komplett	0,1	komplett	komplett	0,1	komplett	komplett
0,01	1,0	„	„	0,01	„	„	0,01	mäßig	stark
0,001	1,0	„	„	0,001	mäßig	stark	0,001	Spur	mäßig
0,000 1	1,0	fast komplett	„	0,000 1	Spur	mäßig	0,000 1	0	0

Trotzdem der Giftauszug während der ganzen Zeit der Aufbewahrung ständig bei Eisschranktemperatur gehalten war, ist der hämolytische Titer in 3 Tagen um über das 10fache, nach 8 Tagen selbst um über das 100fache zurückgegangen. Abgesehen von einem Falle, auf den wir gleich zurückkommen, haben wir auch sonst bei allen Extrakten ziemlich gleichmäßig eine entsprechende Abnahme der Giftigkeit in wenigen Tagen beobachten können. Es wurden deshalb alle Versuche von uns mit frischen 24stündigen oder höchstens 48stündigen Giftextrakten ausgeführt. Andererseits ist aber durch eine 24stündige Mazeration nicht bereits alles Gift aus einer Larve extrahiert worden.

Tabelle 11.

1. Giftabguß nach 24 Stunden ccm	5 %ige Hammelblutaufschwemmung ccm	Ergebnis der Hämolyse nach		2. Giftabguß nach 48 Stunden ccm	Ergebnis der Hämolyse nach		3. Giftabguß nach 72 Stunden ccm	Ergebnis der Hämolyse nach	
		2 Stunden	20 Stunden		2 Stunden	20 Stunden		2 Stunden	20 Stunden
0,1	1,0	komplett	komplett	0,1	komplett	komplett	0,1	stark	fast komplett
0,01	1,0	„	„	0,01	fast komplett	„	0,01	mäßig	mäßig
0,001	1,0	„	„	0,001	mäßig	stark	0,001	Spur	Spur
0,000 1	1,0	fast komplett	„	0,000 1	0	Spur	0,000 1	0	0

Der Versuch zeigt vielmehr, daß man nach jedesmaligem Abgießen der zur Giftextraktion benutzten Flüssigkeitsmenge nach 24 und 48 Stunden noch durch eine zweite und selbst dritte Auslaugung einer bereits mazerierten Larve mit jeweils 1 ccm Kochsalzlösung nicht unbeträchtliche Giftmengen gewinnen kann.

Daß die rasche Abnahme der Giftigkeit der Larvenextrakte in der Tat, entsprechend der Annahme Boehms, auf einer Schädigung des Giftes durch das in den Auszügen auftretende Bakterienwachstum beruht, glauben wir daraus entnehmen zu dürfen, daß in einem Falle, in welchem es zufällig zu keiner Bakterienentwicklung gekommen war, die Mazerationsflüssigkeit selbst noch nach 10 Tagen ihre ursprüngliche Giftigkeit annähernd bewahrt hatte.

Tabelle 12.

24stündiger Giftauszug	5 %ige Hammelblutaufschwemmung	Ergebnis der Hämolyse nach		Derselbe sterilgebliebene Giftauszug 10 Tage alt	Ergebnis der Hämolyse nach	
		2 Stunden	20 Stunden		2 Stunden	20 Stunden
0,1 ccm	1,0 ccm	komplett	komplett	0,1 ccm	komplett	komplett
0,03 „	1,0 „	„	„	0,03 „	„	„
0,01 „	1,0 „	„	„	0,01 „	„	„
0,003 „	1,0 „	„	„	0,003 „	„	„
0,001 „	1,0 „	„	„	0,001 „	„	„
0,000 3 „	1,0 „	„	„	0,000 3 „	fast komplett	„
0,000 1 „	1,0 „	fast komplett	„	0,000 1 „	stark	stark

Sehr gut haltbar ist das Gift in den getrocknet aufbewahrten Larven. In Übereinstimmung mit der schon von Boehm gemachten Beobachtung lieferte auch bei unseren Versuchen eine über Jahresfrist in getrocknetem Zustande aufbewahrte Larve nach 24stündigem Auslaugen einen noch vollwirksamen Giftauszug, dessen hämolytischer Titer für eine 5 %ige Hammelblutaufschwemmung nach 20 Stunden 0,0001 ccm betrug, und der Kaninchen noch in der Dosis 0,05 ccm bei intravenöser Einspritzung innerhalb 20 Minuten tötete.

Außerordentlich gering war auch die Abnahme der Giftigkeit eines Larvenextraktes nach Filtration durch eine Berkefeldkerze.

Tabelle 13. 0,5 ccm Giftextrakt wird mit 0,85%iger Kochsalzlösung auf 10 ccm aufgefüllt und durch Berkefeld-Filter filtriert.

Menge des filtrierten Giftextraktes, der mit Kochsalzauflösung auf 1 ccm aufgefüllt wird	Menge der zugesetzten 5%igen Hammelblutaufschwemmung	Dauer der Bebrütung bei 37°	Ergebnis
0,05 ccm	1 ccm	1 Stunde	komplett
0,02 „	1 „	1 „	„
0,01 „	1 „	1 „	„
0,001 „	1 „	1 „	„
0,000 1 „	1 „	1 „	inkomplett
0,000 01 „	1 „	1 „	0
Unfiltrierter Giftextrakt derselben Herkunft			
0,01 ccm	1 „	1 „	komplett
0,001 „	1 „	1 „	„
0,000 1 „	1 „	1 „	fast komplett
0,000 01 „	1 „	1 „	0

Gegen Erwärmen erwies sich dagegen das Gift nur wenig widerstandsfähig.

Tabelle 14. Prüfung des Giftes auf Wärmeresistenz.

Menge des mit physiol. Kochsalzlösung auf 1 ccm aufgefüllten Giftextraktes	Dauer der Erwärmung im Wasserbade	Temperatur des Wasserbades	Zusatz von 1 ccm 5%iger Hammelblutaufschwemmung und einstündige Bebrütung bei 37°. Ergebnis
0,05 ccm	10 Minuten	50°	komplette Hämolyse
0,05 „	20 „	50°	„ „
0,05 „	10 „	60°	fast komplette Hämolyse
0,05 „	20 „	60°	Spur
0,05 „	30 „	60°	0
0,05 „	10 „	65°	0

Bei diesem Versuch genügte bereits eine Erwärmung während einer ½ Stunde auf 60°, bezw. während 10 Minuten auf 65°, um die hämolytische Wirkung einer Giftmenge von 0,05 ccm vollständig aufzuheben.

Auch durch Säurezusatz wurde das Gift dauernd geschädigt, so daß auch nach späterer Zurückneutralisierung der Extrakt für Tiere in sonst tödlichen Dosen nicht mehr giftig wirkte und auch auf Blutkörperchen nur noch eine verhältnismäßig geringe hämolytische Wirkung ausübte.

Versuch.

0,5 ccm Larvengiftextrakt + 4,5 ccm Kochsalzlösung + 0,05 ccm Acid. hydrochloric. puriss. werden gemischt und bleiben 2 Stunden im Eisschrank stehen.

Tierversuche mit dem Salzsäure-Giftgemisch.

Meerschweinchen 125 erhält 0,1 ccm von dem Gemisch + 0,9 ccm NaCl-Lösung subkutan **lebt**
„ 126 „ 0,4 „ „ „ „ + 0,6 „ „ „ „ **lebt**
„ 127 „ 0,04 „ unbehandelten Giftextrakt subkutan † nach 90 Minuten.

Das Salzsäure-Giftgemisch wird mit Normalsodalösung zurückneutralisiert.

Meerschw. 128 erhält 0,1 ccm von dem neutralisierten Gemisch + 0,9 ccm NaCl Lösung subk. **lebt**

„ 129 „ 0,4 „ „ „ „ „ + 0,6 „ „ „ „ **lebt**

Prüfung des neutralisierten Gemisches auf hämolytische Wirkung

0,5 ccm Giftgemisch (= 0,05 ccm Larvengiftextrakt) + 1 ccm 5 %iges Hammelblut nach 1 Stunde bei 37° komplett

0,05 „ „ (= 0,005 „ „) + 1 „ 5 %iges Hammelblut nach 1 Stunde bei 37° Spur

0,005 „ „ (= 0,0005 „ „) + 1 „ 5 %iges Hammelblut nach 1 Stunde bei 37° 0

Immunisierungsversuche.

Obwohl uns nur noch eine verhältnismäßig kleine Menge gifthaltiger Larven zur Verfügung stand, haben wir doch auch einige Versuche nach der Richtung angestellt, ob sich eine Immunisierung gegen das Gift der Larven durchführen läßt, da derartige Untersuchungen unseres Wissens bisher noch nicht vorgenommen waren, und dieser Frage, namentlich im Hinblick auf die Untersuchungsbefunde Heubners, ein besonderes Interesse zukam. Wir sind bei den Immunisierungsversuchen außerordentlich vorsichtig vorgegangen, haben aber trotzdem dabei einige Tiere verloren. Bei zwei Kaninchen, deren Immunisierung aus dem nachstehenden Protokoll ersichtlich ist, gelang es uns jedoch schließlich die intravenöse Giftzufuhr bis zu dem 200fachen der tödlichen Dosis zu steigern. Allerdings konnten aus Materialmangel die Tiere nicht immer mit 24stündigen Extrakten behandelt werden. Die erste Blutentnahme erfolgte 16 Tage, nachdem das eine Kaninchen 0,01 ccm Giftextrakt intravenös erhalten hatte. Mit der Serumabnahme war 16 Tage gewartet worden, um auch eine etwa verzögerte Vergiftung des Tieres ausschließen zu können.

Tabelle 15. Immunisierung von Kaninchen gegen Larvengiftextrakt.

Kaninchen 81				Kaninchen 82			
Datum 1911	Menge des injizierten Giftextrakts ccm	Art der Injektion	Blut-entnahme	Datum 1911	Menge des injizierten Giftextrakts ccm	Art der Injektion	Blut-entnahme
1. 4.	0,000 001	intravenös	—	1. 4.	0,000 000 5	intravenös	—
8. 4.	0,000 01	„	—	8. 4.	0,000 005	„	—
20. 4.	0,000 05	„	—	20. 4.	0,000 05	„	—
2. 5.	0,000 1	„	—	2. 5.	0,000 1	„	—
8. 5.	0,000 5	„	—	8. 5.	0,000 5	„	—
15. 5.	0,001	„	—	15. 5.	0,001	„	—
23. 5.	0,005	„	—	23. 5.	0,005	„	—
1. 6.	0,005	„	—	1. 6.	0,005	„	—
17. 6.	0,01	„	3. 7. 11	17. 6.	0,01	„	—
8. 7.	0,01	„	—	30. 6.	0,01	„	8. 7. 11
17. 7.	0,02	„	—	17. 7.	0,02	„	27. 7. 11
26. 7.	0,05	„	—	2. 8.	0,05	„	—
2. 8.	0,05	„	—	12. 8.	0,1	„	—
12. 8.	0,1	„	—	23. 8.	0,3	„	—
23. 8.	0,3	„	—	9. 9.	0,7	„	—
9. 9.	0,5	„	—	21. 9.	—	—	entblutet
22. 9.	1,0	„	—				
29. 9.	—	—	entblutet				

Der mit dem Serum der ersten Blutentnahme vorgenommene, in nachstehendem Protokoll wiedergegebene Reagenzglasversuch ergab bereits, daß das Serum des vorbehandelten Kaninchens eine giftneutralisierende Wirkung ausübte.

Tabelle 16. Prüfung des Kaninchen-Immunserums 81.

I. Entnahme vom 3. 7. 11.

Giftextraktmengen (mit Kochsalzlösung auf 1 ccm aufgefüllt)	Serummenge	Bindungsdauer	Menge der zugesetzten 5 %igen Kaninchenblutaufschwemmung	Bebrütungsdauer	Ergebnis der Hämolyse
0,1 ccm	0,2 ccm Im.-Ser. 81	1 Stunde	1 ccm	1 Stunde	komplett
0,01 „	0,2 „ „ 81	1 „	1 „	1 „	„
0,001 „	0,2 „ „ 81	1 „	1 „	1 „	0
0,000 1 „	0,2 „ „ 81	1 „	1 „	1 „	0
0,1 „	0,2 „ Norm.-Ser.	1 „	1 „	1 „	komplett
0,01 „	0,2 „ „	1 „	1 „	1 „	„
0,001 „	0,2 „ „	1 „	1 „	1 „	„
0,000 1 „	0,2 „ „	1 „	1 „	1 „	fast komplett

Das Immunserum vermochte in der Dosis von 0,2 ccm nach einstündiger Bindung bei 37° die hämolytische Wirkung von 0,001 ccm Giftextrakt auf 1 ccm einer 5 %igen Kaninchenblutkörperchenaufschwemmung vollständig aufzuheben, während derselbe Giftextrakt bei Mischung mit normalem Kaninchenserum die gleiche Blutmenge in der Dosis von 0,001 ccm komplett, in der Dosis von 0,0001 ccm fast komplett hämolysierte.

Erheblich viel stärker war dann die antitoxische Wirkung des durch die zweite Blutentnahme gewonnenen Serums, nachdem das Kaninchen bis zu 1,0 ccm 24stündigen Giftextrakts intravenös erhalten hatte.

Tabelle 17. Prüfung des Kaninchen-Immunserums 81.

II. Entnahme vom 29. 9. 1911.

a) Verwendung fallender Giftmengen und gleicher Immunserummengen.

Giftextraktmengen (auf 1 ccm mit Kochsalzlösung aufgefüllt)	Serummenge	Bindungsdauer	Menge der zugesetzten 5 %igen Kaninchenblutaufschwemmung	Bebrütungsdauer	Ergebnis
0,1 ccm	0,2 ccm I.-S. 81	Der Hämolyseversuch wird sofort nach der Mischung von Gift und Serum angesetzt	1 ccm	1 Stunde	komplett
0,05 „	0,2 „ „		1 „	1 „	Spur
0,025 „	0,2 „ „		1 „	1 „	0
0,01 „	0,2 „ „		1 „	1 „	0
0,005 „	0,2 „ „		1 „	1 „	0
0,001 „	0,2 „ „		1 „	1 „	0
0,1 „	0,2 „ „	1 Stunde	1 „	1 „	komplett
0,05 „	0,2 „ „	1 „	1 „	1 „	Spur
0,025 „	0,2 „ „	1 „	1 „	1 „	0
0,01 „	0,2 „ „	1 „	1 „	1 „	0
0,005 „	0,2 „ „	1 „	1 „	1 „	0
0,001 „	0,2 „ „	1 „	1 „	1 „	0

Der mit 0,2 ccm Normalserum versetzte Giftextrakt löst nach einstündiger Bindung bei 37° bis zu 0,001 ccm 1 ccm der Blutkörperchenaufschwemmung komplett, in der Dosis von 0,0001 ccm fast komplett.

Bei diesem Versuch vermochte 0,2 ccm Immunserum die hämolytische Wirkung selbst einer Giftdosis von 0,05 ccm fast vollständig zu neutralisieren, während der gleiche Giftextrakt bei Zusatz von 0,2 ccm Normalserum in der 500fach schwächeren Dosis von 0,0001 ccm dieselbe Blutmenge fast komplett löste. Es ergab sich dabei zugleich die interessante Tatsache, daß das Serum die gleiche giftneutralisierende Kraft entfaltete, einerlei ob der Hämolyseversuch sofort nach Mischung von Gift und Serum angesetzt wurde, oder ob ihm erst eine einstündige Bindung von Gift und Serum bei 37° vorausgegangen war. Es scheinen sonach hier bezüglich der raschen Neutralisation des Giftes durch das Immunserum ähnliche Verhältnisse vorzuliegen, wie sie auch bei Schlangengiften und den dagegen gerichteten Immunseris beobachtet sind. In dieser Hinsicht führte auch ein Versuch, bei welchem fallende Serummengen gegen eine gleiche Giftdosis ausgewertet wurden, zu ganz entsprechenden Ergebnissen.

Tabelle 18. Prüfung der II. Entnahme des Kaninchenserums 81 bei Verwendung gleicher Giftmengen und fallender Immunserummengen.

Immun-Serummenge (auf 0,5 ccm mit Kochsalzlösung aufgefüllt)	Giftmenge (auf 0,5 ccm mit Kochsalzlösung aufgefüllt)	Bindungsdauer	Menge der zugesetzten 5%igen Hammelblutaufschwemmung	Bebrütungsdauer	Ergebnis
0,2 ccm	0,005 ccm	Der Hämolyseversuch wird sofort nach Mischung von Gift und Serum angesetzt	1 ccm	1 Stunde	0
0,1 „	0,005 „		1 „	1 „	0
0,05 „	0,005 „		1 „	1 „	0
0,03 „	0,005 „		1 „	1 „	0
0,01 „	0,005 „		1 „	1 „	komplett
0,005 „	0,005 „		1 „	1 „	„
0,001 „	0,005 „		1 „	1 „	„
0,2 ccm	0,005 ccm	10 Minuten	1 ccm	1 Stunde	0
0,1 „	0,005 „	10 „	1 „	1 „	0
0,05 „	0,005 „	10 „	1 „	1 „	0
0,03 „	0,005 „	10 „	1 „	1 „	0
0,01 „	0,005 „	10 „	1 „	1 „	komplett
0,005 „	0,005 „	10 „	1 „	1 „	„
0,001 „	0,005 „	10 „	1 „	1 „	„
0,2 ccm	0,005 ccm	1 Stunde	1 ccm	1 Stunde	0
0,1 „	0,005 „	1 „	1 „	1 „	0
0,05 „	0,005 „	1 „	1 „	1 „	0
0,03 „	0,005 „	1 „	1 „	1 „	0
0,01 „	0,005 „	1 „	1 „	1 „	komplett
0,005 „	0,005 „	1 „	1 „	1 „	„
0,001 „	0,005 „	1 „	1 „	1 „	„
Normalserum 0,2 ccm	0,005 „	1 „	1 „	1 „	„

Das Serum vermochte immer in gleicher Weise in der Dosis von 0,03 ccm die hämolytische Wirkung einer Giftextraktmenge von 0,005 ccm aufzuheben, gleichgültig, ob dem Hämolyseversuch eine Bindung von Gift und Immunserum von der Dauer

einer Stunde oder von 10 Minuten vorangegangen war, oder ob unmittelbar nach Mischung von Gift und Serum die Blutkörperchenaufschwemmung zugesetzt wurde. Die Wirkung des Immunserums war ferner dieselbe, wenn das Serum aktiv oder inaktiv benutzt wurde.

Eine Auswertung des Immunserums in der Dosis von 0,03 ccm gegen abgestufte Giftmengen konnten wir aus Materialmangel nicht mehr ausführen, da die noch verwertbaren Larven zur Prüfung der Wirkung des Serums am lebenden Tier verwendet worden waren. Über die zunächst in dieser Hinsicht mit dem Immunserum von Kaninchen 82 angestellten Versuche gibt das nachstehende Protokoll Aufschluß.

Versuch.

Prüfung der giftneutralisierenden Wirkung des Immunserums von Kaninchen 82 an Kaninchen.

I. Serumentnahme vom 8. 7. 11.

Kan. 115, 1200 g erhält in 1 ccm Kochsalzlösung 0,01 ccm Giftextrakt, der mit 0,4 ccm Immunserum von Kaninchen 82 bei 37° eine Stunde gestanden hat, intravenös. Das Tier zeigt keinerlei Krankheitserscheinungen und bleibt am Leben.

Kan. 114, 1300 g erhält als Kontrolle 0,01 ccm desselben Giftextraktes + 0,4 ccm Normal-Kaninchenserum nach 1 stündigem Stehen bei 37° intravenös. Das Tier stirbt innerhalb 24 Stunden.

Kan. 112, 1200 g erhält als Kontrolle 0,005 ccm desselben Giftextraktes intravenös und stirbt innerhalb 24 Stunden.

II. Serumentnahme vom 27. 7. 11.

Kan. 120, 2650 g erhält in 1 ccm Kochsalzlösung 0,02 ccm Giftextrakt, der eine Stunde bei 37° mit 0,1 ccm Immunserum von Kaninchen 82 gemischt gestanden hat. Das Tier zeigt keine Krankheitserscheinungen und bleibt am Leben.

Kan. 121, 2270 g erhält als Kontrolle in 1 ccm Kochsalzlösung 0,02 ccm desselben Giftextraktes + 0,2 ccm Normalserum intravenös. Das Tier stirbt innerhalb 24 Stunden.

Kan. 122, 2000 g erhält als Kontrolle 0,005 ccm desselben Giftextraktes intravenös und stirbt innerhalb 24 Stunden.

Von dem Serum der ersten Blutentnahme, vor welcher das Kaninchen 82 steigende Giftdosen bis 0,01 ccm intravenös erhalten hatte, war durch 0,4 ccm nach einstündigem Stehen bei 37° 0,01 ccm Giftextrakt so neutralisiert, daß ein mit dem Giftserumgemisch intravenös behandeltes Kaninchen von 1200 g auf die Injektion nicht erkrankte, während dieselbe Giftmenge, mit Normalserum versetzt und eine Stunde bei 37° gehalten, ein 1300 g schweres Kaninchen innerhalb 24 Stunden tötete. Ein zweites 1200 g schweres Kontrolltier, welches intravenös 0,005 ccm desselben Extraktes erhalten hatte, starb ebenfalls innerhalb der gleichen Zeit.

Das durch die zweite Blutentnahme gewonnene Serum — das Kaninchen 82 hatte vorher 0,02 ccm Giftextrakt intravenös erhalten — machte bei der gleichen Versuchsanordnung in der Dosis von 0,1 ccm 0,02 ccm Giftextrakt unwirksam. Da die Kontrolltiere innerhalb 24 Stunden zugrunde gegangen waren, so hatte bei diesem Versuch 0,1 ccm des Immunserums mindestens die 4fache tödliche Dosis zu neutralisieren vermocht. An einigen kleinen Kaninchen haben wir die Schutzwirkung des Serums auch in der Weise geprüft, daß wir den Tieren in die Ohrvene des einen

Ohres Immunserum und sofort oder nach 2 Stunden dannn in die Ohrvene des anderen Ohres 0,01 ccm Giftextrakt injizierten.

Tabelle 19. Prüfung des Immunserums 82 am Kaninchen.

Nr.	Gewicht des Kaninchens	Menge des Serums	Zeit zwischen Injektion des Immunserums und des Giftes	Giftmenge	Resultat
1	ca. 850 g	3 ccm Normalserum	sofort	0,01 ccm	† innerhalb 24 Stunden
2	„ 850 „	1 „ Immunserum	2 Stunden	0,01 „	**lebt**
3	„ 850 „	3 „ „	2 „	0,01 „	**lebt**
4	„ 850 „	1 „ „	sofort	0,01 „	**lebt**

Die intravenöse Einspritzung von 1,0 ccm Immunserum von Kaninchen 82 schützte sonach kleine Kaninchen von 850 g sowohl gegen die unmittelbar anschließende wie gegen die 2 Stunden später erfolgende Injektion von 0,01 ccm eines Giftextraktes, der in derselben Dosis ein mit 3 ccm Normalserum vorbehandeltes Kontrolltier innerhalb 24 Stunden tötete.

Weitere Schutzversuche sowie Heilversuche konnten von uns aus Materialmangel nicht mehr vorgenommen werden. Ebenso war es uns nicht mehr möglich, einige Sera von Kaninchen zu prüfen, welche wir absichtlich entweder nur mit mehrere Tage alten, in ihrer Giftigkeit stark zurückgegangenen Giftextrakten oder mit Extrakten aus durch Hitze abgetöteten, ungiftigen Larven vorbehandelt hatten.

Sind unsere Immunisierungsversuche somit auch nur unvollständig geblieben, so beweisen sie doch, daß eine erfolgreiche Immunisierung gegen das Gift der Larven von Diamphidia simplex (Diamphidia locusta) möglich ist, und daß auch dem Serum solcher immunisierten Tiere eine nicht unbeträchtliche giftneutralisierende Wirkung zukommt. Es ist bei der Beurteilung dieser Versuchsergebnisse noch zu berücksichtigen, daß die geprüften Immunsera nur mit verhältnismäßig kleinen Giftdosen hergestellt waren und dennoch eine bemerkenswerte, antitoxische Kraft entfalteten.

Wenn uns noch weitere, brauchbare Larven zur Fortführung der Immunisierung der Tiere mit noch weiter gesteigerten größeren Giftdosen zur Verfügung gestanden hätten, so wäre es wahrscheinlich möglich gewesen, noch erheblich hochwertigere Sera zu erhalten.

Abschließend sei noch erwähnt, daß beide Immunsera auch Präzipitine gegen Larveneiweiß enthielten und in der Dosis von 0,1 ccm in 0,5 ccm einer Verdünnung des Larvenextraktes 1 : 100 ein deutliches Präzipitat hervorriefen. In den aus Käfern und Cocons gewonnenen Extrakten bewirkten dagegen auch bei stärkeren Konzentrationen die Sera keine Trübung oder Ausfällung. Auch bei Komplementbindungsversuchen bewirkte das Serum bis zu der Dosis von 0,03 ccm eine Hemmung der Komplementwirkung, aber ebenfalls nur wenn als Antigen Extrakt aus natürlich getrockneten Larven (in der Menge von 0,01 ccm), nicht aber Auszüge aus getrockneten Larven oder aus Käfern oder Puppenschalen verwendet wurden.

Sämtliche von uns aus Käfern und Coconschalen hergestellte Extrakte erwiesen sich als vollkommen ungiftig.

Literatur.

1. Le Vaillants Reise in das Innere von Afrika. Frankfurt a. M. 1790 und Annales de la Soc. entomologique de France II ème Sér. T. IX 1851 (zitiert nach Lewin).

2. Baines, Explorations in South-West Afrika. London 1864.

3. Livingstone, Narrative of an expedition to the Zambesi. London 1865.

4. Schinz, Deutsch-Südwest-Afrika. Forschungsreisen durch die deutschen Schutzgebiete 1884—1887. Oldenburg und Leipzig.

5. Schinz mit Beiträgen von Boehm und Fairmaire, Über das Pfeilgift der „Kalixari-San". Biologisches Zentralblatt, Bd. 14. 1894.

6. Lewin, Die Pfeilgifte. Berlin 1894.

7. Boehm, Über das Gift der Larven von Diamphidia locusta. Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, Bd. 38. 1897.

8. Starcke, Über die Wirkungen des Giftes der Larven von Diamphidia locusta (Pfeilgift der Kalahari). Ebenda.

9. Heubner, Über das Pfeilgift der Kalahari. Ebenda Bd. 57. 1907.

10. Trommsdorf, Experimentelle Untersuchung über eine von Buschleuten zum Vergiften der Pfeilspitze benutzte Käferlarve. Archiv für Schiffs- und Tropen-Hygiene, Bd. 15, 1911. Heft 19.

Zusammenfassende Übersichten:

11. Faust, Die tierischen Gifte. Braunschweig 1906, S. 217—220.

12. Derselbe, Darstellung und Nachweis tierischer Gifte. Abderhalden, Handbuch der Biochemischen Arbeitsmethoden Bd. II, S. 893—895.

Über die Wirkungen des Eosins auf Tiere.

I. Teil.

Fütterungsversuche mit Eosin und Eosingerste.

Von

Regierungsrat Dr. med. vet. **C. Titze,**
Mitglied des Kaiserlichen Gesundheitsamts.

Die zu Futterzwecken in das Zollinland eingeführte Gerste wird seit Oktober 1909 durch Anfärbung mit Eosin (Tetrabromfluoreszeinnatrium) gekennzeichnet, um zu verhindern, daß diese zum ermäßigten Zollsatze von 1,30 M. für den Doppelzentner abgelassene Gerste als Braugerste verwendet wird. Nach den über die Ausführung der Kennzeichnung im Jahre 1909 erlassenen Vorschriften wurden auf 1 qm Fläche Futtergerste bei 1 m Schichthöhe 2 Liter einer wässerigen 2 vom Hundert enthaltenden Lösung von Eosin verwendet. Hierbei werden etwa 5 vom Hundert der Körner gefärbt. Die Menge der Farbstofflösung für die angegebene Gerstenmenge ist auf 1,6 l herabgesetzt worden, da auch damit eine ausreichende Kennzeichnung der Gerste zu erzielen war. Bei der Anwendung von 1,6 l einer 2%igen Eosinlösung zur Denaturierung von 1 cbm (= 650 kg) Gerste entfallen auf das Kilogramm denaturierter Gerste 0,0492 oder rund 0,05 g Eosin. Weitere Versuche haben gezeigt, daß der angestrebte Zweck auch mit einer 1 vom Hundert enthaltenden Lösung von Eosin erreicht wird. Deshalb dient nunmehr zur zollamtlichen Kennzeichnung von Gerste eine wässerige 1 vom Hundert enthaltende Lösung von Eosin, deren Menge je nach der Art des verwendeten Färbeapparates und der Schichthöhe etwas schwankt, während 1,6 l für 1 m Schichthöhe und 1 qm als Grundlage geblieben sind.

Die jetzt geltende „Anleitung zur zollamtlichen Kennzeichnung von Gerste“ (vergl. Nachrichtenblatt für die Zollstellen, Beilage zu Nr. 21 vom 1. Nov. 1910), die im wesentlichen mit den bereits erwähnten ursprünglichen Vorschriften aus dem Jahre 1909 übereinstimmt, hat folgenden Wortlaut:

1.

Zur zollamtlichen Kennzeichnung von Gerste dient eine wässerige, 1. v. H. Eosin enthaltende Lösung.

2.

I. Beschaffenheit, Bezug und Prüfung des Eosins.

Als Eosin zur Kennzeichnung von Gerste ist das Natriumsalz des Tetrabromfluoreszeins zu verwenden. Dies muß

1. mindestens 75 v. H. Eosinsäure enthalten,
2. frei von allen Füllstoffen und fremden Farbstoffen sein

und darf

3. höchstens 1 v. H. Chloride, berechnet als Kochsalz, aufweisen,
4. gesundheitsschädliche Stoffe, besonders Arsen und Schwermetalle, nicht oder doch nur in solchen Spuren enthalten, die nach § 10 des Gesetzes vom 5. Juli 1887, betreffend die Verwendung gesundheitsschädlicher Farben bei der Herstellung von Nahrungsmitteln und Gebrauchsgegenständen (Reichs-Gesetzbl. S. 277) außer Acht bleiben.

3.

Das Eosin ist in Pulverform, bei geringem Bedarfe zweckmäßig in Packungen von 1 kg, bei größerem Bedarf in entsprechend größeren Packungen, von einer der in Anlage 1 aufgeführten Fabriken zu beziehen. Diese Fabriken haben sich der Kaiserlichen Technischen Prüfungsstelle gegenüber unter Vorlage verbindlicher Vergleichsmuster verpflichtet, nur Eosin von der in Ziffer 2 angegebenen Beschaffenheit zur Kennzeichnung von Gerste zu liefern.

4.

Von dem zur Kennzeichnung der Gerste zu verwendenden Eosin ist, wenn Zweifel hervortreten, ob der Farbstoff den in Ziffer 2 angegebenen Anforderungen entspricht, sonst aber beim Bezuge jeder zehnten Sendung ein Muster von etwa 25 g zur Prüfung auf seine Beschaffenheit der Kaiserlichen Technischen Prüfungsstelle in Berlin NW. 6, Luisenstraße 32, einzusenden. Die letztere hat eine etwaige Beanstandung dieser Muster der betreffenden Zollstelle und allen denjenigen Direktivbehörden, in deren Dienstbezirke Kennzeichnungen von Gerste vorkommen, unverzüglich mitzuteilen sowie dem Reichskanzler (Reichsschatzamt) anzuzeigen.

5.

II. Herstellung der Farbstofflösung.

Die zu der zu bereitenden Farbstofflösung (Ziffer 1) erforderliche Menge Eosin — auf 100 l Farbstofflösung kommt 1 kg Farbstoff — wird in einem offenen Gefäß (Eimer oder dergleichen) mit reinem Leitungs- oder Brunnenwasser nach und nach übergossen. Die Auflösung des Farbstoffpulvers wird durch Umrühren beschleunigt. Nach kurzem Absitzen wird die Lösung von dem ungelösten Anteile durch ein feines Sieb in das zur Aufnahme der Farbstofflösung dienende Vorratsgefäß gegossen. Der ungelöste Anteil des Farbstoffs wird in der gleichen Weise mit immer neuen Mengen Wasser so oft behandelt, bis aller Farbstoff aufgelöst ist. Sofern die für die zu bereitende Farbstofflösung zu verwendende Wassermenge beim Auflösen des Farbstoffs noch nicht völlig aufgebraucht ist, wird im Vorratsgefäße noch soviel Wasser zugesetzt, bis das der Farbstoffmenge entsprechende Maß erreicht ist. Nach sorgfältigem Umrühren ist die Farbstofflösung gebrauchsfertig.

Anlage 1.

Zusammenstellung

der Fabriken, die zur Kennzeichnung von Gerste geeignetes Eosin herstellen, nebst Angabe der Fabrikmarken und der von den Fabriken mitgeteilten Preise.

1. Aktiengesellschaft für Anilinfabrikation in Berlin.
   Eosin F. F. extra:
   4,75 ℳ für 1 kg, bei größeren Bezügen in Faßpackung.
2. Badische Anilin- und Soda-Fabrik in Ludwigshafen am Rhein.
   Eosin G. F. G. neu:
   4,40 ℳ für 1 kg in Faßpackung von 25 kg an,
   4,55 ℳ für 1 kg in Dosen von 2 bis 10 kg
   — Frachtsendungen frei, netto Kasse —.
3. Farbwerke vorm. Meister Lucius & Brüning in Höchst am Main.
   Eosin extra G. F. salzfrei:
   4,40 ℳ für 1 kg in Faßpackung,
   4,55 ℳ für 1 kg in Büchsenpackung
   — frei Verwendungsstelle (Hafen, Schuppen usw.), Ziel 30 Tage netto ohne Skonto —.
4. Farbwerke Mühlheim in Mühlheim a/M.
   Eosin extra 000:
   4,75 ℳ für 1 kg in Dosen und Faßpackung, Lieferung frei.

6.

Die Farbstofflösung kann auch in der Weise hergestellt werden, daß ein feines Sieb oder ein Siebtrichter auf das Vorratsgefäß gesetzt und der Farbstoff auf das Sieb gebracht wird. Sodann gießt man reines Wasser auf das Sieb, rührt mit einem harten Pinsel um und fährt mit dem Zusatze des Wassers so lange fort, bis der Farbstoff sich vollständig aufgelöst hat. Das Vorratsgefäß wird darauf mit Wasser auf das der Menge des Farbstoffs entsprechende Maß aufgefüllt.

7.

Bei Frostwetter ist zur Bereitung der Lösung nach Bedarf warmes Wasser oder, falls dies nicht möglich sein sollte, ein Zusatz von höchstens 2. v. H. Kochsalz zu verwenden.

8.

III. Ausführung der Kennzeichnung.

(1) Die Gerste wird entweder im ruhenden Zustand und zwar in loser Schüttung in Schiffen, Eisenbahnwagen oder Lagern oder in Säcken von der Oberfläche aus, oder während der Bewegung beim Entladen und zwar unmittelbar im Anschluß an den Durchgang durch selbsttätige Wiegevorrichtungen gekennzeichnet. Die hierzu erforderlichen Vorrichtungen werden bis auf weiteres von der Firma F. W. Meyer in Hameln geliefert. Diese ist auch verpflichtet, auf Erfordern über alle die Benutzung und Behandlung der Vorrichtungen im allgemeinen betreffenden Fragen Auskunft zu erteilen und die Beamten im Gebrauche der Vorrichtungen zu unterweisen.

(2) Falls ausnahmsweise andere Verfahren oder Vorrichtungen benutzt werden sollen, ist zunächst eine Verständigung über deren Brauchbarkeit und Zulassung mit dem Reichskanzler (Reichsschatzamt) herbeizuführen.

(3) Die Ausführung der Kennzeichnung ist stets von einem Oberbeamten zu leiten.

9.

A. Kennzeichnung von Gerste im ruhenden Zustand.

(1) Die Kennzeichnung von Gerste im ruhenden Zustand beruht auf dem Grundsatz, daß die in die Gerste von der Oberfläche her in feinen Strahlen eingeführte Farbstofflösung infolge ihres Eigengewichts die Gerstenschichten senkrecht durchrieselt, hierbei die Körner färbend bestreicht und dadurch kennzeichnet.

(2) Den verschiedenen Bedürfnissen entsprechend werden Messingrohrvorrichtungen in verschiedenen Größen und Formen verwendet.

10.

1. In loser Schüttung in Schiffen, Eisenbahnwagen oder in Lagern.

(1) Die zur Kennzeichnung von Gerste in loser Schüttung in Schiffen, Eisenbahnwagen oder in Lagern gewöhnlich benutzte Vorrichtung besitzt eine Oberfläche von $2^1/_2 \times 1$ m und ist folgendermaßen eingerichtet:

(2) In einem eisernen, zweckmäßig mit Handgriffen an den Längsseiten versehenen Rahmen liegen 12 Messingrohre (Verteilungsrohre) von 15 mm Durchmesser in der Längsrichtung nebeneinander. Die Rohre tragen an der Unterseite in Abständen von 7 cm versenkte Abflußöffnungen von 1 mm Weite. Diese danach mit über 400 Ausflußöffnungen versehenen Rohre bewirken die gleichmäßige Verteilung der Farbstofflösung in feinen Strahlen.

(3) Im Mittelpunkte der Vorrichtung befindet sich ein Messingaufsatz mit einem Fülltopf, aus dem durch vier geschweifte Ableitungsrohre die Farbstofflösung in das Rohrnetz verteilt wird, und zwar so, daß die vier Ableitungsrohre zunächst zwei quer über dem Rahmen liegende Messingrohre (Querrohre) von 25 mm Durchmesser speisen. Die Querrohre stehen durch Kreuzverbindungsstücke mit je zwei Durchgangskanälen mit den längsliegenden Verteilungsrohren in Verbindung. Die Verteilungsrohre werden von den höher liegenden beiden Querrohren in vier Abteilungen gleichmäßig gespeist. Die Querrohre sind in der Mitte durch einen Korkverschluß getrennt, so daß jeder der vier Abteilungen eine gleichmäßige Menge Farbstofflösung zugeführt wird. Die längsverlaufenden Verteilungsrohre haben jedes drei Korkverschlüsse im Innern, und

zwar je einen in der Mitte und je zwei zwischen den Ablaufkanälen der Kreuzverbindungsstücke. Demnach werden die Verteilungsrohre für die Farbstofflösung in mehreren für sich abgeschlossenen Abteilungen unter gleichem Flüssigkeitsdruck und mit der gleichen Menge der Farbstofflösung aus dem Fülltopf gespeist. Sie lassen daher in allen Teilen der Vorrichtung gleiche Mengen der Farbstofflösung austreten, auch wenn die Vorrichtung nicht genau wagerecht liegt.

11.

Sofern die Oberfläche der in den einzelnen Schiffsabteilungen lagernden losen Gerste sich mit den in Ziffer 10 beschriebenen Vorrichtungen in der Länge und Breite nicht ganz bedecken läßt, sind außerdem Ausgleichungsvorrichtungen von geringeren Abmessungen, von $2^1/_2 \times 0{,}60$ und $1^1/_2 \times 0{,}80$ m zu verwenden.

12.

(1) Zur Kennzeichnung der in Schiffen unter festem Deck, unter Kajütsüberbauten, unter dem Gangbord oder sonst von oben her nicht frei zugänglich lagernden Gerste dienen Stechvorrichtungen, die seitwärts in die verdeckt lagernde Gerste geschoben werden.

(2) Die Stechvorrichtungen finden in verschiedenen Längen von 0,70 bis 4,20 m je nach der Bauart der verschiedenen Schiffe und der Anordnung der Ladung Verwendung. Sie sind schmaler als die in Ziffer 10 beschriebene Vorrichtung; Stechvorrichtung Nr. 13a der Anlage 2 hat nur vier Verteilungsrohre, während die übrigen Stechvorrichtungen aus sieben in gleicher Richtung verlaufenden Verteilungsrohren bestehen. Letztere haben 1 mm weite Ausflußlöcher in 7 cm Abstand voneinander, sind in Stahlbänder gelagert, 0,70 m vom Ende aufrecht gebogen, dann gekröpft und münden in einen kupfernen Fülltrichter. An ihrem freien Ende haben die Verteilungsrohre Stahlspitzen, damit die Vorrichtungen leicht durch die Gerste geschoben werden können.

13.

(1) Der Fülltopf jeder der zur Färbung von Gerste in ruhendem Zustand dienenden Vorrichtungen hat im Innern eine Litereinteilung und faßt eine abgemessene Menge Farbstofflösung, welche der von der Vorrichtung bedeckten Fläche der Gerste und ihrer Schichthöhe entspricht. Unten im Topfe befindet sich ein feines Sieb aus Bronzegewebe, welches sich der Topfwandung stets dicht anschließen muß, damit ein Eindringen von Schmutzteilen in die Rohre verhindert wird. Der Fülltopf hat an der Unterseite einen kegelförmigen, mit zwei nebeneinander liegenden Durchgangsöffnungen versehenen Messinguntersatz, der mit einem entsprechend geformten eingeschliffenen Messingaufsatz der Vorrichtung einen dichten Verschluß bildet. In dem Aufsatz befinden sich ebenfalls zwei Abflußlöcher in genau gleicher Größe und Anordnung, so daß durch Drehung des Fülltopfes der Ablauf geöffnet und geschlossen werden kann. Der Kopf des Aufsatzes ist zur besseren Abdichtung mit Bajonettverschluß versehen. Durch Drehung des Fülltopfes nach links wird der Ablauf verschlossen, durch Rechtsdrehung des Topfes geöffnet. Unter den Abflußöffnungen befindet sich in dem Aufsatz eine Aussparung, in der ein feines Sieb aus Bronzegewebe liegt, das etwaige feste Rückstände der Farbstofflösung zurückhält. Unter diesem Siebe münden die vier geschweiften Ableitungsrohre, welche die Farbstofflösung durch die beiden Zuführungsrohre nach den längsverlaufenden Verteilungsrohren leiten.

(2) Da die im vorstehenden Absatz erwähnten Verschlüsse bei nicht richtiger Handhabung zuweilen vor der Füllung nicht abgesperrt wurden und dadurch zur Verschmutzung des Schiffsbodens Anlaß gegeben haben, sind sie bei einer Anzahl von Vorrichtungen versuchsweise durch Drehschieber (Hähne) mit Hebel ersetzt worden.

14.

Vor Beginn der Kennzeichnung ist die Oberfläche der lose geschütteten Gerste mit Schaufeln, Brettschiebern oder dergleichen zu ebnen, damit die Vorrichtungen gleichmäßig wagerecht aufgelegt werden können.

15.

Falls bei Schiffsladungen die Gerste mittschiffs höher liegt als einwärts, so können die Vorrichtungen in ihrer Längsrichtung an den schräg lagernden Flächen verwendet werden, da die Verteilungsrohre auch in schräger Lage bis zu 20 Grad gleichmäßig gespeist werden.

16.

Die Verteilungsrohre müssen so in die Oberfläche der Gerste eingebettet werden, daß sie von der Gerste 3 bis 5 cm hoch bedeckt sind, damit die aus den Öffnungen rieselnden Farbstrahlen unmittelbare Führung in die Gerste erhalten. Vor Beginn der Kennzeichnung sind die Fülltöpfe sorgfältig und dicht auf die Vorrichtungen zu setzen; die Verschlüsse sind abzusperren. Hierauf wird die erforderliche Menge Farbstofflösung auf einmal in den Fülltopf gegossen und durch Öffnen des Verschlusses in die Gerste entleert.

17.

Die Menge der im einzelnen Falle in der Regel zu verwendenden Farbstofflösung ist aus der anliegenden Tafel (Anlage 2) zu entnehmen. Die Menge der Farbstofflösung richtet sich nach der Höhe der Gerstenschicht sowie nach der Beschaffenheit der Gerste. Dabei ist zu berücksichtigen, daß sehr trockene Gerste, solche mit viel Staub und aufsaugendem Besatze sowie solche mit dicken Spelzen bei gleicher Schichthöhe mehr Farbstofflösung aufnimmt, als reine dünnschalige und feuchtere Gerste. Die in der Tafel angegebenen Mengen sind hiernach gegebenenfalls etwas zu vergrößern oder zu verkleinern, damit die Farbstofflösung jedesmal tunlichst einige Dezimeter oberhalb des Bodens vollständig von der Gerste aufgenommen wird, ohne daß größere Schichten ganz ungefärbt bleiben und ohne daß der Boden selbst angefärbt wird.

18.

Den störenden Einwirkungen des Frostes in der kalten Jahreszeit ist dadurch vorzubeugen, daß die Farbstofflösungen bei Frostwetter unmittelbar vor ihrer Verwendung in der in Ziffer 7 angegebenen Weise hergestellt oder daß bereits vorrätige Lösungen durch Dampf oder in anderer geeigneter Weise erhitzt und in diesem Zustand verwendet werden. Auch empfiehlt es sich, die Geräte vor Beginn der Kennzeichnung entweder mit warmem Wasser zu durchspülen oder warme Dämpfe in sie einzuleiten. Da, wo ein Aufstellen der die Farbstofflösung aufnehmenden Behälter im Freien sich nicht vermeiden läßt, ist nach Möglichkeit auf Wärmeschutz Bedacht zu nehmen.

19.

(1) Da die Farbstofflösung schnell versickert, können die Vorrichtungen, sobald die Flüssigkeit aus dem Fülltopf verschwunden ist, weiter gelegt werden.

Anlage 2.

Tafel für die Bemessung der beim Färben von Gerste in loser Schüttung mit den Meyerschen Färbevorrichtungen zu verwendenden Farblösung.

Schütthöhe der Gerste	I. Rahmenapparat			II. Stechapparat						
	Nr. 2 2,50 × 1 m	Nr. 4 2,50 × 0,60 m	Nr. 5 u. 6 1,50 × 0,80 m	Nr. 10 0,70 m lang	Nr. 11 1,20 m lang	Nr. 11a 1,50 m lang	Nr. 12 2 m lang	Nr. 12a 2,50 m lang	Nr. 13 3 m lang	Nr. 13a 4,20 m lang
m	l	l	l	l	l	l	l	l	l	l
1	4	2 1/4	2	1	1 1/4	1 1/2	2	2 1/4	2 1/4	2 1/4
1,25	5 1/4	2 3/4	2 1/4	1 1/4	1 1/2	2	2 1/4	2 1/2	2 3/4	2 3/4
1,50	6 1/2	3 1/4	2 1/2	1 1/2	2	2 1/4	2 1/2	3	3 1/4	3 1/4
1,75	7 3/4	3 3/4	3	1 3/4	2 1/2	2 3/4	3	3 1/2	3 3/4	3 3/4
2	9	4 1/4	3 1/2	2	3	3 1/4	3 1/2	4	4 1/4	4 1/4
2,25	10 1/2	5	4	2 1/4	3 1/2	3 3/4	4	4 1/2	5	5
2,50	12	5 3/4	4 3/4	2 1/2	4	4 1/4	4 3/4	5 1/4	5 3/4	5 3/4
2,75	13 1/2	6 3/4	5 1/2	2 3/4	4 1/2	5	5 1/2	6	6 3/4	6 3/4
3	15	7 3/4	6 1/2	3	5	5 3/4	6 1/2	7	7 3/4	7 3/4
3,50	18	9 3/4	7 3/4	3 1/2	6	6 3/4	7 1/2	8 1/2	9 3/4	9 3/4
4	21	11 3/4	9 1/4	4	7	8 1/4	9 1/2	10 1/2	11 3/4	11 3/4
4,50	24 1/2	13 3/4	10 1/2	4 1/2	8	9	10 1/2	12	13 3/4	13 3/4
5	28	16	12	5	9	10 1/4	12	14	16	16

(2) Die Verlegung der Rahmenvorrichtungen erfolgt zweckmäßig erst in seitlicher, dann in Längsrichtung. Beim Verlegen sind die Rahmenvorrichtungen stets senkrecht hochzuheben und ebenso wieder niederzulegen; insbesondere ist ein Schleifen über die Oberfläche der gefärbten Gerste zu vermeiden, da diese hierdurch mit Farbe beschmutzt wird.

(3) Die Verlegung der Stechvorrichtungen ergibt sich aus den besonderen Umständen. Bei der Verwendung von Stechvorrichtungen muß zu der zu kennzeichnenden Gerste mindestens an einer Seite ein Zugang frei gelegt werden, damit die Vorrichtungen von da aus möglichst nahe der Oberfläche der Gerste und tunlichst in wagerechter Richtung eingeführt werden können.

20.

(1) Falls hierzu nicht eher Veranlassung vorliegt, sind die Vorrichtungen nach beendeter Färbung täglich mit Wasser durchzuspülen, um festzustellen, ob einzelne Löcher verstopft sind. Gegebenenfalls sind diese mit einem Stecher zu öffnen.

(2) Von Zeit zu Zeit sind auch die Siebe im Fülltopf und im Aufsatz der Vorrichtungen herauszunehmen und zu reinigen.

(3) Sollten sich im Laufe des Gebrauchs Rückstände des Farbstoffs in den Verteilungsrohren angesammelt haben, so sind die vor den Eisenrahmen sitzenden Kopfschrauben loszunehmen und die Rohre durch Wasserspülung zu reinigen.

(4) Die Rohre aller Vorrichtungen sind vor Verbiegungen und Verletzungen zu bewahren. Sämtliche Schraubendichtungen müssen in Ordnung gehalten werden. Schmutz und Gerstenkörner dürfen nicht in die Füllbehälter gelangen.

21.

2. In Säcken.

Zur Kennzeichnung von Gerste in Säcken dienen tragbare oder am Boden stehende Metallbehälter, die durch eine Pumpe die Menge der Farbstofflösung nach Einstellung der Hubhöhe selbsttätig abmessen und durch sternförmig angeordnete Ausflußröhren (Sternvorrichtungen) der Gerste zuführen.

22.

(1) Die tragbare Vorrichtung (Tornistervorrichtung) besteht in der Hauptsache aus einem tornisterartigen, etwa 15 bis 20 Liter fassenden Metallbehälter. In dem Behälter liegt eine Pumpe, die durch einen Kettenzug in Tätigkeit gesetzt wird. Bei jedem Hube wird eine mittels einer Messingmeßvorrichtung zu regelnde Menge der Farbstofflösung aus der Pumpe entleert und durch einen Metallschlauch den sternförmigen Färbevorrichtungen zugeführt.

(2) Die Farbstofflösung wird mit einer Kanne durch eine mit einem Deckel verschließbare Öffnung in den Behälter eingefüllt. Unter dieser Öffnung befindet sich ein Sieb, das das Eindringen von Schmutz und Staub verhindert.

(3) Die Einstellung der erforderlichen Menge der Farbstofflösung geschieht durch einen Stift an der Messingmeßvorrichtung. Je nach dem Gewicht und der Höhe des Sackes sowie nach der Beschaffenheit der Gerste sind 50 bis 150 ccm in Abstufungen von je 20 ccm zu verwenden. Für jeden Sack ist die Menge der Farbstofflösung so zu regeln, daß letztere nicht bis auf den Boden des Sackes durchschlägt, sondern daß ihre nach unten rieselnden Strahlen in einer Entfernung von etwa 15 cm vom Boden des Sackes von der Gerste vollständig aufgenommen sind.

(4) Der mit der Ausführung der Kennzeichnung der Gerste betraute Arbeiter trägt den Metallbehälter wie einen Tornister auf dem Rücken. In der rechten Hand hält er die sternförmige Färbevorrichtung; mit der linken Hand bedient er den Kettenzug, der mit dem Pumpenhebel in Verbindung steht. Beim Beginne der Kennzeichnung wird zunächst mit der rechten Hand die Sternvorrichtung so tief in die Mitte der Oberfläche der Gerste versenkt, daß die Rohre etwa 3 bis 5 cm hoch von der Gerste bedeckt sind. Nachdem dies geschehen, wird der Kettenzug angezogen und gleich darauf wieder freigelassen, so daß ein Gegengewicht frei gegeben wird, das nunmehr auf den Hebel drückt und die Farbstofflösung in die Gerste preßt.

(5) Nachdem der Hebel durch das Loslassen des Kettenzugs auf den Ruhepunkt zurückgegangen ist, wird nach einigen Sekunden der am Handgriff der Sternvorrichtung angebrachte Gummiball zusammengedrückt, wodurch die in den Sternrohren verbliebenen Reste der Farbstofflösung herausgeblasen werden.

(6) Die Steuervorrichtung muß stets wagerecht in die Gerste eingebettet und bei der Verlegung senkrecht herausgehoben werden, damit die durch die Sternrohre in der Gerstenoberfläche gebildeten Rillen mit ungefärbter Gerste zulaufen, und ein Beschmutzen des Sackes beim Zubinden vermieden wird. Alsdann wird die Sternvorrichtung zum nächsten Sacke geführt. Bei vorsichtiger Ausführung werden die Säcke durch Nachtropfen der Farbstofflösung nicht beschmutzt.

23.

(1) Die in Ziffer 22 beschriebene Vorrichtung kann auch so eingerichtet sein, daß sie auf dem Boden steht und daß die Pumpe durch einen Tritt auf einen Fußhebel in Bewegung gesetzt wird.

(2) Im übrigen werden diese stehenden Färbevorrichtungen ebenso gehandhabt wie die tragbaren.

24.

Bei beiden Ausführungsformen (Ziffer 22 und 23) ist vor Beginn der Kennzeichnung der Metallbehälter mit einigen Litern Wasser zu füllen und zu versuchen, ob alle Auslauflöcher der Sternrohre gleichmäßig laufen. Ist dieses nicht der Fall, so müssen die etwa verstopften Löcher mit einem Stecher geöffnet werden. Auch muß darauf geachtet werden, daß Unreinlichkeiten nicht in den Flüssigkeitsbehälter hineingeraten.

25.

Die Säcke müssen stets gerade aufrecht stehend und mit umgeschlagenem Rande der Zollbehörde vorgeführt werden.

26.

Das Antrocknen des Farbstoffs ist in wenigen Stunden beendet. Nach mindestens 4 Stunden kann die Ladung gelöscht und können die Säcke entleert werden.

27.

B. Kennzeichnung von Gerste während der Bewegung.

(1) Die Kennzeichnung von Gerste während der Bewegung geschieht entweder bei der Entladung von Gerste aus Schiffen oder Eisenbahnwagen, sofern hier das Löschen mit Hilfe von Elevatoren, Greifern, Becherwerken oder ähnlichen Vorrichtungen vorgenommen wird, oder, wenn Gerste vom Lager genommen, auf einer selbsttätigen Wage verwogen und dann in Säcke gefüllt wird. In allen diesen Fällen geschieht die Färbung unmittelbar im Anschluß an den Durchgang der Gerste durch die selbsttätige Wage, sei es, daß die Gerste sogleich aus der Wage in Säcke fällt oder zunächst noch eine längere oder kürzere Rohrleitung zu durchlaufen hat.

(2) Die hierzu dienende Vorrichtung wird in das Gestell der selbsttätigen Wage eingebaut und durch deren Eigenbewegung in Tätigkeit gesetzt.

(3) Der Hauptteil der Vorrichtung ist ein Messingzylinder mit angegossenem Ventilgehäuse, in dem sich ein Kolben befindet, der durch den Druck der Farbstofflösung vor- und rückwärts bewegt wird und bei jedem Hube eine abgemessene Menge Farbstofflösung in die beim Kippen der Wageschale in den Rumpf fallende Gerste spritzt. Die Zuführung der Farbstofflösung aus dem Behälter nach dem Spritzrohre wird durch einen Vierwegehahn bewirkt. Das Spritzrohr verläuft quer unter der Wage durch den Rumpf und enthält eine größere Zahl kleiner Ausspritzröhrchen, die bei jedesmaliger Ausschüttung der Wageschale die Farbstofflösung in die fallende Gerste verteilen.

(4) Die Bewegung des Vierwegehahns wird bei Ausschüttung der Wage dadurch betätigt, daß beim Kippen der Wageschale ein Hebel jedesmal den Zulauf der Farbstofflösung in dem Vierwegehahne doppelt wirkend öffnet und den Ablauf schließt. Die Vorrichtung läßt sich für jede gewünschte Menge der Farbstofflösung durch Stellringe einstellen.

28.

(1) Der Behälter für die Farbstofflösung muß je nach den örtlichen Verhältnissen 2 bis 3 m hoch stehen, da die Einführung der Flüssigkeit unter einem entsprechenden Drucke zum Eigenbetriebe des Zylinderkolbens erfolgen muß. Die Behälter sind zweckmäßig so groß zu wählen, daß die Menge der Farbstofflösung für einen Tagesabtrieb ausreicht.

(2) Zum Schutze gegen Einfrieren sind die Behälter und die Rohrleitungen, durch die die Farbstofflösung der Färbevorrichtung zugeführt wird, nach Möglichkeit mit Wärmeschutzvorrichtungen zu versehen; auch ist nach Bedarf bei Frostwetter zur Bereitung der Lösung warmes Wasser zu verwenden oder Kochsalz hinzuzufügen (vergl. Ziffer 7).

29.

Die Menge der zur Kennzeichnung von Gerste während der Bewegung zu verwendenden Lösung richtet sich nach der Beschaffenheit der Gerste (vergl. Ziffer 17). Im allgemeinen werden 40 bis 50 ccm Farbstofflösung zum Färben von einem Sack üblicher Größe ausreichend sein.

30.

Für die Art der Anbringung der Vorrichtung (Ziffer 27) in der Wage und das davon abhängige Einspritzen der Farbstofflösung in die Gerste läßt sich nur die allgemeine Anweisung geben, daß darauf zu achten ist, die Färbung so zu leiten, daß nur die Gerste, nicht aber der unter der Wage befindliche Trichter benetzt wird. Wie dies zu geschehen hat, muß im einzelnen Falle, nötigenfalls unter Zuziehung eines Vertreters der Firma F. W. Meyer (Ziffer 8 Abs. 1), ausprobiert werden.

31.

IV. Mitwirkung der Kaiserlichen Technischen Prüfungsstelle.

Sofern anders nicht zu behebende Schwierigkeiten bei der Kennzeichnung der Gerste entstehen, ist die Kaiserliche Technische Prüfungsstelle alsbald davon zu benachrichtigen und um gutachtliche Äußerung anzugehen.

Als mit der Kenntlichmachung der Futtergerste mittels Eosin in größerem Umfange begonnen worden war, erschienen Mitteilungen in der Tagespresse, daß die Verwendung der Eosingerste Übelstände im Gefolge habe. Namentlich wurde behauptet, daß die Verfütterung von Eosingerste an Haustiere, vor allem an Schweine, schwere Gesundheitsstörungen und eine Entwertung des Fleisches und Fettes bewirke. Die Eosingerste werde nur mit Widerwillen von den Haustieren gefressen und erzeuge bei den Tieren eine Entzündung des Magens und Darmes und bei Schweinen nach längerer Verabreichung auch eine Rotfärbung des Fettes und Fleisches. Diese Mitteilungen haben in den Kreisen der Interessenten große Beunruhigung hervorgerufen. Die Mitteilungen über die angebliche Schädlichkeit der mit Eosin gekennzeichneten Futtergerste standen in völligem Gegensatze zu dem Ergebnis eines Versuches, der im amtlichen Auftrage vor Erlaß der Vorschriften über die Kennzeichnung der Futtergerste mit dem in Frage stehenden Farbstoff durch das Kaiser Wilhelms-Institut in Bromberg ausgeführt worden war.

Das genannte Institut hatte auf Anordnung des Königlich Preußischen Herrn Ministers für Landwirtschaft, Domänen und Forsten in der Zeit vom 22. August bis 8. Dezember 1908 in Bromberg auf dem Versuchsgute Mocheln einen Versuch über die Wirkung der Verfütterung der Eosingerste an 30 nach Rasse, Alter und Gewicht gleichartigen Schweinen angestellt, die in drei verschiedene Gruppen geteilt wurden. Alle Versuchstiere bekamen gleichmäßig ein Grundfutter von Fleischmehl und Kartoffeln, daneben aber die Gruppe I zur Kontrolle ungefärbte Gerste, die Gruppe II dagegen Gerste, von der 5 vom Hundert, später 10 vom Hundert der Körner mit Eosin angefärbt worden waren, und die Gruppe III Gerste, die mit Eosin vollständig angefärbt worden war. Die Eosingerste rief in diesem Versuche, der über 3 Monate währte, keinerlei schädliche Wirkungen bei den Versuchstieren hervor. Der Gesundheitszustand der Tiere war

während der Dauer des Versuchs ungetrübt, und die Gewichtszunahme stellte sich bei den mit Eosingerste gefütterten Tieren sogar noch etwas günstiger als bei den mit ungefärbter Gerste gefütterten Kontrolltieren. Die Gewichtszunahme betrug auf das Stück und den Tag berechnet, im Mittel bei den Kontrolltieren der Gruppe I 0,542 kg, bei den mit 5- und 10%iger Eosingerste gefütterten Tieren — Gruppe II — 0,571 kg und bei den mit ganz gefärbter Gerste gefütterten Tieren — Gruppe III — 0,576 kg. Auf die Beschaffenheit des Fleisches und Fettes hat das Eosin, wie die Schlachtung der Tiere lehrte, keinen Einfluß gehabt.

Als die Klagen über die angebliche Schädlichkeit der mit Eosin gefärbten Futtergerste auftauchten, wurden auch im Kaiserlichen Gesundheitsamte Versuche angestellt.

Diesen Versuchen ist nachstehender Plan zugrunde gelegt worden. Es sollte durch toxikologische Versuche die Wirkung des Eosins und durch Fütterungsversuche die Wirkung der mit Eosin gefärbten Gerste im wesentlichen also ermittelt werden:

A. Toxikologische Versuche.

I. An kleinen Versuchstieren (Mäusen, Meerschweinchen, Kaninchen und Hunden) werden die Giftwirkungen des Eosins beobachtet und bei verschiedener Applikationsweise Wirkungsart und Wirkungsstärke festgestellt.

Außerdem soll versucht werden, die Schicksale und Ausscheidung des Eosins, der entsprechenden Jodverbindung, des Erythrosins, und der Muttersubstanz, des Fluoreszeins, zu verfolgen.

II. Bei Schweinen wird der Giftigkeitsgrad des Eosins durch Verfütterung zu ermitteln versucht.

B. Fütterungsversuch.

Hierzu werden 20 nach Rasse, Alter und Geschlecht gleichartige Läuferschweine verwendet, die nach dem Ausfall eines Vorversuchs in drei hinsichtlich der prozentualen Zunahmen des Körpergewichts möglichst gleiche Gruppen zusammengestellt werden, und zwar in eine

Gruppe I mit 7 Schweinen, die täglich eine den üblichen Fütterungsverhältnissen entsprechende große Menge 5%igen Eosingerstenschrotes erhalten, d. h. von Schrot aus Gerste, bei der im Durchschnitt auf 100 Körner 5 mit Eosin angefärbte kommen;

Gruppe II mit gleichfalls 7 Schweinen, die in derselben Weise gefüttert werden wie die Tiere der Versuchsgruppe I, aber statt des 5%igen Gerstenschrotes, Schrot aus gänzlich gefärbter Eosingerste bekommen;

Gruppe III mit 6 Schweinen, die in der nämlichen Weise gefüttert werden wie die Tiere der Versuchsgruppen I und II, aber statt des Eosingerstenschrotes zur Kontrolle Schrot aus ungefärbter Gerste derselben Herkunft erhalten.

Neben dem Gerstenschrot bekommen alle Schweine das gleiche Beifutter.

Nach etwa 8 Tagen werden von Gruppe I und II je zwei Schweine und aus Gruppe III ein Schwein geschlachtet. Die übrigen Schweine werden nach 3 Monaten getötet, falls nicht die Versuchsergebnisse einen anderen Zeitpunkt als wünschenswert erscheinen lassen.

Außerdem wurde vorbehalten, Fütterungsversuche in ähnlicher Weise wie bei den Schweinen bei Geflügel und Kaninchen und in kleinerem Umfange, lediglich zur Orientierung, auch bei Rindern auszuführen. Der Hauptwert ist auf die Fütterungsversuche bei den Schweinen gelegt worden, weil die denaturierte Futtergerste hauptsächlich zur Mast von Schweinen Verwendung findet.

Ob ein Übertritt des Eosins in das Blut und eine Ausscheidung mit dem Harn stattfindet, sollte durch öfters wiederholte spektroskopische Untersuchungen festgestellt werden.

Ausführung der Versuche.

An Schweinen wurden dem Versuchsplan gemäß toxikologische Versuche mit Eosin und Fütterungsversuche mit Eosingerste angestellt.

Neben den in erster Linie ins Auge gefaßten Fütterungsversuchen an Schweinen wurden auch solche an Hühnern, Tauben und Kaninchen sowie an Rindern vorgenommen.

Die Versuche sind in folgender Weise zur Ausführung gelangt.

A. Versuche an Schweinen.

I. Toxikologische Versuche.

Über die Wirkung größerer Mengen von Eosin auf Schweine lagen nach Ausweis der Literatur Versuche noch nicht vor. Zur Klärung dieser Frage sind 5 Läuferschweine im Alter von ungefähr 4 Monaten verwendet worden, die zugleich mit den 20 für die Fütterungsversuche bestimmten Schweinen aus einer und derselben Zucht angekauft und mit diesen zusammen auch den Vorversuchen zur Ermittelung des Gesundheitszustandes und des durch die Gewichtszunahmen sich aussprechenden Futterverwertungsvermögens unterworfen worden waren. Zu den toxikologischen Versuchen wurden diejenigen Schweine verwendet, die nach Bildung der zur Durchführung der Fütterungsversuche erforderlichen, hinsichtlich des prozentual berechneten Futterverwertungsvermögens möglichst übereinstimmenden drei Gruppen (vergl. S. 157) übrig geblieben waren. Es waren dies die Schweine, die bei der Einstellung in die Versuchsstallungen des Kaiserlichen Gesundheitsamtes die Nummern 4, 5, 8, 13 und 24 erhalten hatten. Mit Ausnahme des Schweines Nr. 5 hatten die Schweine in der Vorversuchsperiode keinerlei Krankheitserscheinungen erkennen lassen. Sämtliche Schweine, auch Nr. 5, haben in der Vorversuchsperiode an Gewicht zugenommen. Das Schwein Nr. 5, auf das noch zurückgekommen werden wird, war während der Vorversuchsperiode, die bis zum 3. Januar 1910 währte, und an den beiden darauffolgenden Tagen fieberhaft erkrankt und zeigte verringerte Freßlust.

Um die etwaige Giftigkeit des Eosins für Schweine zu ermitteln, erhielten die fünf Schweine reines Eosin, das in erheblichen Mengen dem Futter zugesetzt wurde.

Versuch I. Zunächst bekamen, um die Wirkung einer einmaligen hohen Eosingabe festzustellen, zwei Schweine (Nr. 4 und 8), die zu Beginn des Versuchs am 3. Januar 1910 ein Gewicht von 60,2 und 63,5 kg aufwiesen, je 300 g (= rund 5 g auf das Kilogramm Körpergewicht) reines Eosin, das in 1 l Wasser gelöst, mit 1 kg gekochten Kartoffeln, 1 kg Gerstenschrot und 1 ½ l Magermilch gemischt und so jedem

der beiden Schweine vorgesetzt wurde. Das Schwein Nr. 4 erhielt das mit Eosin gemischte Futter am 5. Januar 1910 morgens 9 Uhr vorgesetzt, nachdem es seit dem Nachmittag des vorhergehenden Tages gehungert hatte. Es fraß sofort $^2/_3$ des Eosinfuttergemisches und den Rest binnen 6 Stunden. Es nahm auch sein gewöhnliches Abendfutter und das Futter am nächsten Morgen gut auf und zeigte keinerlei Krankheitserscheinungen. Das Tier wurde am 6. Januar 1910 geschlachtet.

Schlachtbefund. Das Schwein Nr. 4 hatte sich bei der Aufnahme des mit Eosin gemischten Futters äußerlich stark mit Eosin beschmutzt. Diese Eosinfärbung der Haut blieb auch bestehen, als nach der Schlachtung das gewerbsübliche Brühen vorgenommen worden war. Im übrigen waren der Inhalt und die Schleimhaut des ganzen Verdauungskanals durch Eosin stark rot gefärbt, mit Ausnahme der Magenschleimhaut, die in ihrem Drüsenteile die Farbe nur wenig angenommen hatte. Ferner waren Galle und Harn durch Eosin stark gerötet. Dagegen zeigten weder das Fettgewebe noch das Muskelfleisch, noch die sonstigen Teile des Tierkörpers auch nur die Spur einer abnormen Färbung.

Das Schwein Nr. 8 fraß von dem ihm am 7. Januar 1910 vorgesetzten, 300 g Eosin enthaltenden Futterbrei sofort etwa $^1/_4$, den Rest aber erst in den beiden nächsten Tagen. Nachdem es das mit 300 g Eosin vermischte Futter verzehrt hatte, bekam es vom 10. Januar bis zum 2. Februar außer gekochten Kartoffeln und etwas Magermilch als Hauptfutter täglich 2,5 kg Schrot aus 5%iger Eosingerste, um festzustellen, ob vielleicht die einmalige große Eosingabe nicht unmittelbar nach ihrer Verabreichung, sondern erst nach einiger Zeit eine nachteilige Wirkung auf die Gesundheit des Tieres äußerte. Das Verhalten des Schweines war aber dauernd normal. Insbesondere war seine Futteraufnahme gut, und das Tier hat auch bis zum 1. Februar dauernd an Gewicht zugenommen (vergl. Tabelle I am Schluß). Um die Wirkung großer Eosingaben bei längerer Verabreichung kennen zu lernen, erhielt das Schwein Nr. 8 vom 2. Februar an bis zum 3. März 1910 täglich 0,5 g Eosin auf 1 kg Körpergewicht. Das Tier hat das mit Eosin in der Menge von 0,5 g auf 1 kg Körpergewicht versetzte Futter stets gut gefressen. Krankheitserscheinungen sind auch während dieser Versuchsperiode nicht hervorgetreten. Sein Lebendgewicht stieg vom 7. Januar bis zum 3. März von 60 kg auf 99 kg, in 55 Tagen also um 39 kg oder täglich um 0,71 kg (vergl. Tabelle I).

Vom Schweine Nr. 8 sind bis zum 3. März 1910 insgesamt rund 1600 g Eosin mit dem Futter aufgenommen worden. Am 3. März 1910 wurde das sehr gut genährte Schwein geschlachtet.

Schlachtbefund. Das Schwein zeigte vor dem Brühen eine ziemlich gleichmäßige Rotfärbung der Haut, die, wie beim Schwein Nr. 4. durch Beschmutzung beim Fressen zustande gekommen war. Nach dem Brühen des Schweines und nach dem Entfernen der Borsten erwies sich die Haut nur noch an vereinzelten Stellen durch Eosin gefärbt. Mithin saß der Farbstoff in der Hauptsache in den Epithelien der Haut, die beim Brühen entfernt werden. Auch beim Schwein Nr. 8 waren die Schleimhaut und der Inhalt des ganzen Verdauungskanals durch Eosin gefärbt,

und es fand sich auch bei ihm Eosin in Galle und Harn, während an allen übrigen Teilen eine Veränderung durch Eosin nicht zu erkennen war.

Versuch II. Zwei weitere Schweine (Nr. 13 und 24), die bei der Wägung am 3. Januar 1910 Gewichte von 60,4 kg (Nr. 13) und 55,6 kg (Nr. 24) aufgewiesen hatten, erhielten am 6. und 7. Januar mit dem Futter insgesamt je 240 g Eosin. Die beiden Tiere nahmen das Eosinfuttergemisch langsam im Laufe der beiden Tage und ließen hiernach keinerlei Krankheitserscheinungen erkennen.

Das eine der beiden Schweine (Nr. 13) wurde bald darauf, am 10. Januar 1910, geschlachtet. Auch bei diesem Tiere war, abgesehen von einer Färbung der Haut und der Schleimhaut des Verdauungskanals, eine Färbung anderer Teile des Tierkörpers nicht nachzuweisen. In der Galle und im Harne fand sich Eosin.

Das zweite mit 240 g Eosin gefütterte Schwein (Nr. 24) ist ähnlich wie das Schwein Nr. 8 vom 7. Januar bis zum 2. Februar mit ungefärbtem Futter ernährt worden, um etwaige Nachwirkungen der an das Tier verabreichten großen Eosingabe feststellen zu können. Solche sind aber nicht aufgetreten. Das Tier zeigte sich stets munter und nahm das ihm verabreichte Futter mit reger Freßluft auf. Es hat auch dauernd an Gewicht zugenommen (vergl. Tabelle I). Vom 2. Februar 1910 an bis zum 1. April erhielt das Schwein Nr. 24 täglich 0,5 g Eosin auf 1 kg Körpergewicht mit seinem Futter und nahm bis zum 1. April insgesamt rund 3000 g Eosin auf, ohne irgendwelche Krankheitserscheinungen zu zeigen. Sein Gewicht ist von 52,6 kg am 7. Januar auf 120,5 kg am 5. April (Tag der letzten Wägung) gestiegen. Die Gesamtgewichtszunahme betrug demnach in 88 Tagen 67,9 kg, und die tägliche Gewichtszunahme 0,77 kg.

Am 1. April 1910 wurde bei dem Schwein Nr. 24 die Fütterung der großen Eosingaben eingestellt. Das Tier sollte am 7. April geschlachtet werden und erhielt bis dahin neben dem anderen Futter Schrot von ganz gefärbter Eosingerste in der Tagesmenge von 2,5 kg auf 50 kg Lebendgwicht. Bei der Schlachtung des sehr gut genährten Tieres am 7. April ist folgender Befund erhoben worden.

Schlachtbefund. Auch das Schwein Nr. 24 hatte sich beim Fressen äußerlich mit Eosin beschmutzt. Die Eosinfärbung der Haut verschwand aber völlig, als das Brühen vorgenommen worden war. Der Inhalt und die Schleimhaut des ganzen Verdauungskanals waren durch Eosin rot gefärbt. Auch Galle und Harn waren durch Eosin stark gefärbt. Sonst ließ sich an keinem Körperteil, insbesondere weder am Fettgewebe noch am Muskelfleisch eine Färbung durch Eosin nachweisen.

Versuch III. Das fünfte für die toxikologischen Versuche bestimmte Schwein (Nr. 5) hatte, wie bereits erwähnt, zu Beginn des Versuchs fieberhaft erhöhte Eigenwärme und verringerte Freßlust. Es wurde geflissentlich, trotz der Erkrankung, in den Versuch genommen und zur Feststellung benutzt, ob die Verabreichung von Eosingerste bei kranken Tieren eine andere, ungünstigere Wirkung zeigt als bei gesunden.

Die Körpertemperatur des Tieres betrug morgens am 1. Januar 1910 40,3° C, am 2. Januar 40,7° C, am 3. Januar 40,9° C, am 4. Januar 40,8° C, am 5. Januar 39,2° C und sank dann wieder zur Norm. Das Gewicht des Schweines Nr. 5 betrug am 3. Januar 1910 55,2 kg.

Vom 3. bis zum 14. Januar bekam das Schwein zunächst 5%iges Eosingerstenschrot, ohne daß bei ihm besondere Erscheinungen hervortraten; das Tier erholte sich vielmehr während der Fütterung mit Eosingerste wieder völlig.

Vom 14. Januar bis zum 22. Februar 1910 erhielt das Schwein Nr. 5 wie die Schweine Nr. 8 und 24 nach Verabreichung der einmaligen großen Eosingaben täglich 0,5 g Eosin auf 1 kg Körpergewicht, so daß es bis zum 22. Februar insgesamt mehr als 1 3/4 kg (genau 1796 g) Eosin verzehrt hatte. Das Allgemeinbefinden des Tieres war hierbei stets gut. Sein Körpergewicht betrug am 22. Februar 111 kg, die tägliche Zunahme demnach 1 1/2 kg. Am 23. Februar 1910 wurde die Verabreichung des Eosins unterbrochen, da der Ausfall des Versuchs beim Schwein Nr. 5 mit dem der Parallelversuche bei den Schweinen Nr. 8 und 24 völlig übereinstimmte. Das Tier ist am 4. März in sehr gutem Ernährungszustande geschlachtet worden, nachdem es vom 23. Februar an gewöhnliches, ungefärbtes Futter erhalten hatte. Durch die Fütterung mit ungefärbtem Futter vor der Schlachtung sollte beim Schwein Nr. 5 ermittelt werden, ob die Färbung der Haut und der Schleimhaut des Magens und Darmes sowie das Vorhandensein von Eosin in Galle und Harn, die bei den alsbald nach der Verabreichung des stark eosinhaltigen Futters geschlachteten Tieren festzustellen waren, auch noch später nachweisbar sind. Bemerkt sei, daß das Gewicht des Tieres am 1. März 1910 117,2 kg betragen hatte.

Schlachtbefund. Bei dem Tiere ist lediglich an der Einmündungsstelle des Schlundes in den Magen die obere Schleimhautschicht mit Eosin leicht angefärbt gewesen. Ferner ließ sich in der Galle und im Harn noch Eosin nachweisen. Sonst zeigte sich nirgends eine abnorme Färbung des Tierkörpers.

Die wesentlichen Ergebnisse der vorstehend geschilderten Versuche lassen sich dahin zusammenfassen, daß

1. weder die einmalige Verabreichung ungewöhnlich großer Eosingaben (240—300 g pro Tier oder 4—5 g auf das Kilogramm Körpergewicht), die das Tausendfache von dem betragen, was ein Schwein bei der Verabreichung von vorschriftsmäßig denaturierter Gerste im höchsten Falle aufnehmen kann, noch

2. die lange Zeit fortgesetzte Verfütterung sehr großer Eosingaben (0,5 g auf das Kilogramm Körpergewicht täglich und Gesamtmengen von 1 1/2—3 kg an Schweine von etwa 1—2 Zentner Gewicht im Verlaufe von 39—85 Tagen) die geringsten Gesundheitsstörungen bei den zu den Versuchen benutzten Schweinen hervorgerufen hat.

Die Tiere sind dauernd gesund geblieben, haben stets gut gefressen und, wie die Gewichtszunahmen zeigten, ihr Futter vorzüglich ausgenützt. Bei den alsbald nach der Eosinfütterung geschlachteten Schweinen war die Haut und die Schleimhaut des Magens und Darmes angefärbt. Dagegen

war weder eine Anfärbung von Fett und Fleisch noch eine Herabsetzung der Güte dieser Teile des Tierkörpers festzustellen.

Eine Giftwirkung des Eosins bei Schweinen nach Verfütterung von Mengen, die bei der Verabreichung denaturierter Futtergerste als Futtermittel für Schweine auch nicht annähernd in Frage kommen, konnte somit nicht erzielt werden.

Da es sich bei den Versuchen lediglich um die Frage einer Giftwirkung des Eosins bei der Aufnahme mit dem Futter handelte, ist von einer anderen Einverleibungsart als der auf dem Wege des Verdauungsapparates Abstand genommen worden. Von der Verfütterung noch größerer einmaliger als der bei den Schweinen Nr. 4, 8, 13 und 24 verabreichten Eosinmengen (4—5 g auf das Kilogramm Körperwicht) mußte abgesehen werden, weil die Schweine Futter mit wesentlich stärkeren Eosinbeimengungen nicht freiwillig aufgenommen hätten und die künstliche Einverleibung mit Hilfe der Schlundsonde bei den sich hiergegen sehr stark sträubenden Schweinen ein gewaltsamer Eingriff ist, der an sich schon zu Schädigungen der Gesundheit führen kann.

II. Fütterungsversuche mit Eosingerste.

Zu den Fütterungsversuchen sind 20 Schweine verwendet worden, die zusammen mit den 5 zu den toxikologischen Versuchen verwandten Schweinen aus einem und demselben Bestande bezogen worden waren. Es waren etwa 4 Monate alte weibliche Läufer der weißen veredelten Landrasse. Weiße Schweine wurden gewählt, weil bei der Verabreichung des Eosins an die Möglichkeit einer photodynamischen Wirkung gedacht werden mußte, die nur bei Tieren mit unpigmentierter Haut unter gleichzeitiger Einwirkung der Besonnung zutage tritt. Gewisse fluoreszierende Substanzen und solche Stoffe, aus denen sich nach der Einverleibung in den Tierkörper fluoreszierende Substanzen abscheiden, können in der unpigmentierten Haut bei Einwirkung von Sonnenlicht entzündliche Veränderungen hervorrufen. Beim Eosin konnte auf die Möglichkeit gerechnet werden, daß sich aus ihm im Tierkörper Fluoreszein abspaltet. Sehr wichtig war, daß die Tiere gesund waren und nicht an einer Seuche litten; denn eine glatte Durchführung der Versuche war nur bei völlig gesunden Tieren möglich. Es sei gleich bemerkt, daß die Beobachtung während des Vorversuchs und die weitere Beobachtung während der Fütterungsversuche ergab, daß die Tiere völlig gesund und insbesondere frei von Seuchen waren. Endlich wurde Wert darauf gelegt, daß die Tiere gleichaltrig und gleichen Geschlechts waren und daß nur solche Tiere geliefert wurden, die nach den Gewichtsermittelungen des Vorbesitzers, eines bekannten Züchters der Mark Brandenburg, bis zur Abgabe an das Kaiserliche Gesundheitsamt gleichmäßig an Gewicht zugenommen hatten.

Mit Rücksicht auf die sorgsame Auswahl der Tiere und auf den Umstand, daß sie durchweg bis zur Ablieferung unter den nämlichen Verhältnissen gehalten worden waren, wurde kein Bedenken getragen, die Schweine alsbald nach ihrer Einstellung in die Versuchsstallungen des Kaiserlichen Gesundheitsamtes zu wiegen und dem Vorversuche zu unterwerfen. Die Tiere sind zum ersten Male am 29. Dezember 1909,

und 6 Tage darauf, am 3. Januar 1910, zum zweiten Male gewogen worden. Die Tiere erhielten während dieser Zeit als Futter auf 50 kg Lebendgewicht

2 kg Gerstenschrot, $1^1/_2$ kg Kartoffeln, $1^1/_2$ l Magermilch.

Da die Tiere aus einem und demselben Stalle stammten und sich nach Angabe des durchaus zuverlässigen Vorbesitzers bis zur Abgabe gleichmäßig entwickelt hatten, wurde ein kurzer Vorversuch zur Beobachtung des Gesundheitszustandes und des Futterverwertungsvermögens für ausreichend erachtet und auf Grund des Ergebnisses der Wägung am 3. Januar die Einteilung der Tiere in die drei Versuchsgruppen (S. 151) derart vorgenommen, daß die Gesamtgewichte der Tiere der drei Versuchsgruppen und ihre prozentualen Gewichtszunahmen annähernd übereinstimmten. Nach Maßgabe dieser Gesichtspunkte kamen in

die Gruppe I, die zur Fütterung mit 5 %igem Eosingerstenschrot bestimmt war,
die Schweine mit den Nummern 1, 3, 6, 7, 10, 12, 16,

die Gruppe II, die zur Fütterung mit Schrot aus gänzlich gefärbter Gerste bestimmt war,
die Schweine mit den Nummern 9, 11, 15, 17, 20, 21, 26,

die Gruppe III, die zur Kontrolle mit Schrot aus ungefärbter Gerste der nämlichen Herkunft gefüttert werden sollte,
die Schweine mit den Nummern 2, 18, 19, 22, 23, 25.

Die Gewichtsverhältnisse der Tiere zu Beginn und am Ende des Vorversuchs, der auf die kürzeste Zeit beschränkt wurde, um die Versuche ungesäumt in Angriff nehmen zu können, sind aus nachfolgender Zusammenstellung ersichtlich.

Gruppe I				Gruppe II				Gruppe III			
Nr. des Schweines	Gewicht am 29. 12. 09 kg	Gewicht am 3. 1. 10 kg	Gewichtsveränderung kg	Nr. des Schweines	Gewicht am 29. 12. 09 kg	Gewicht am 3. 1. 10 kg	Gewichtsveränderung kg	Nr. des Schweines	Gewicht am 29. 12. 09 kg	Gewicht am 3. 1. 10 kg	Gewichtsveränderung kg
1	64,2	73,5	+ 9,3	9	48,5	54,0	+ 5,5	2	61,4	67,0	+ 5,6
3	55,0	61,2	+ 6,2	11	55,7	62,7	+ 7,0	18	59,0	68,3	+ 9,3
6	53,8	58,5	+ 4,7	15	63,2	71,2	+ 8,0	19	60,0	67,0	+ 7,0
7	52,2	58,5	+ 6,3	17	52,8	63,3	+ 10,5	22	51,2	62,0	+ 10,8
10	56,9	65,1	+ 8,2	20	57,4	68,7	+ 11,3	23	50,5	58,0	+ 7,5
12	53,2	62,1	+ 8,9	21	53,0	61,9	+ 8,9	25	51,0	57,6	+ 6,6
16	57,6	66,9	+ 9,3	26	61,2	67,0	+ 5,8				
Insges.	392,9		+ 52,9		391,8		+ 57,0		333,1		+ 46,8

Somit betrugen die Anfangsgewichte sämtlicher Schweine der Gruppen I, II und III

392,9 kg (7 Schweine der Gruppe I),
391,8 „ (7 „ „ „ II),
333,1 „ (6 „ „ „ III),

die Gewichtszunahmen

52,9 kg = 13,5 % bei Gruppe I,
57,0 „ = 14,5 „ „ „ II,
46,8 „ = 14,0 „ „ „ III.

Die drei Gruppen stimmten also hinsichtlich der Anfangsgewichte und der prozentualen Gewichtszunahmen sehr gut überein. Die verhältnismäßig hohen Gewichtszunahmen der Tiere während der Versuchsperiode erklären sich dadurch, daß die Tiere durch den Transport und durch die Gewöhnung an die neuen Verhältnisse bei Einstellung in die Versuchsstallungen des Kaiserlichen Gesundheitsamtes zunächst an Gewicht verloren hatten.

Die Tiere wurden nach Einstellung in den Versuch so gehalten, daß das Sonnenlicht möglichst stark auf sie einwirken konnte.

Als Futter bekamen die Tiere das bereits angegebene Gemisch von 2 kg Gerstenschrot (zu 5% mit Eosin gefärbt — Gruppe I —, vollständig mit Eosin gefärbt — Gruppe II — und ungefärbt — Gruppe III —) mit $1^1/_2$ kg Kartoffeln und $1^1/_2$ l Magermilch auf 50 kg Lebendgewicht täglich, somit eine sehr große Gerstenmenge. Diese wurde von der zweiten Versuchswoche an unter Verringerung der Kartoffelmenge auf $2^1/_2$ kg auf 50 kg Körpergewicht täglich gesteigert, eine Menge, die nur ausnahmsweise in einzelnen Gegenden, wie in Schleswig-Holstein, an Schweine als Mastfutter verabreicht wird. Die Versuche wurden demnach unter Bedingungen angestellt, die eine schädliche Wirkung des Eosins hätten zeigen müssen, falls ihm eine solche zukommt. Zur vollständigen Färbung der Gerste, die an die Tiere der Gruppe II verfüttert werden sollte, wurden für 1 cbm = 650 kg Gerste 40 l einer 2%igen wässerigen Eosinlösung verbraucht. Diese Eosinmenge entspricht der 20 fachen Menge der 2%igen Eosinlösung, die nach der ursprünglichen Vorschrift zur Kennzeichnung der Gerste (vergl. S. 143) verwandt wurde, um etwa 5% der Gerstenmenge anzufärben. Die Gerste wurde in einem großen Steingutkasten mit der Eosinlösung nach und nach in kleinen Mengen übergossen und so lange umgerührt, bis sich an Proben feststellen ließ, daß jedes Korn ausreichend gefärbt war. Die gänzlich gefärbte Gerste wurde dann zum Trocknen ausgebreitet. Die zu 5 v. Hundert gefärbte Gerste wurde durch Vermischen von 17,5 kg vollständig gefärbter Gerste mit 332,5 kg ungefärbter Gerste gewonnen.

Eosingerste des Handels wnrde nicht benutzt, weil es für den Verlauf der Versuche von Bedeutung war, daß die Schweine aller drei Gruppen Gerste derselben Herkunft erhielten. Unterschiede in der Güte der ganz gefärbten, zu 5% gefärbten und der ungefärbten Gerste, ferner das Vorhandensein von Verunreinigungen wie z. B. mit Unkrautsamen in einem Teile der zur Verwendung gelangenden Gerste hätten das Ergebnis der Fütterungsversuche in unerwünschter Weise beeinflussen können.

Die Tiere wurden in einem vom Tageslichte gut erhellten Stalle gehalten und außerdem fast täglich um die Mittagszeit 3 bis 4 Stunden lang ins Freie gebracht, um sie der Wirkung der Sonnenstrahlen auszusetzen. Nur bei Regenwetter blieben die Schweine im Stalle.

Alle Schweine wurden täglich zu wiederholten Malen, namentlich bei der Futteraufnahme, beobachtet. Hierbei zeigte es sich, daß die Schweine das Mischfutter mit Schrot aus ganz gefärbter und aus zu 5% gefärbter Eosingerste mit derselben Begierde fraßen wie das Mischfutter mit Schrot aus ungefärbter Gerste. Bei allen Tieren wurde ferner täglich morgens vor der ersten Fütterung die Körpertemperatur

gemessen. Diese hat sich bei allen Tieren der drei Gruppen stets in normalen Grenzen bewegt. Einen Überblick über das Verhalten der Körpertemperaturen der Versuchsschweine Nr. 10, 20 und 2 bieten die Temperaturkurven am Schluß[1]).

Von Zeit zu Zeit ist den Schweinen Blut entnommen und von ihnen auch Harn aufgefangen worden, um diese Flüssigkeiten auf Eosin zu untersuchen. Da die Blutentnahme und die Harngewinnung mit einer ziemlich großen Beunruhigung der Tiere verbunden waren, so legten wir uns in der Zahl dieser Untersuchungen eine gewisse Beschränkung auf; jedoch wurde die Untersuchung des Blutes auf Eosin bei jedem Tier im allgemeinen am Anfang, in der Mitte und am Schluß des Versuchs ausgeführt.

Die Ergebnisse dieser im Pharmakologischen Laboratorium des Kaiserlichen Gesundheitsamtes ausgeführten Untersuchungen sind in der Tabelle Nr. II im einzelnen übersichtlich zusammengestellt. Im wesentlichen hat es sich dabei gezeigt, daß unter den eingehaltenen Versuchsbedingungen im Blutserum Eosin nicht nachzuweisen war, daß aber Galle und Harn Eosin und zwar in sehr kleinen Mengen enthielten. Das Eosin ist also zu einem entsprechend kleinen Teil in den Säftestrom übergetreten.

Am 10. und 11. Januar, nach achttägiger Dauer des Versuchs, wurden aus der ersten Gruppe die Schweine Nr. 3 und 6, aus der zweiten die Schweine Nr. 11 und 17 und aus der dritten Gruppe das Schwein Nr. 23 geschlachtet.

Bei den Schweinen Nr. 3 und 6, die 5 %iges Eosingerstenschrot erhalten hatten, zeigte sich nur eine leichte gelbrötliche Anfärbung des kutanen Teils der Schleimhaut des Magens an der Einpflanzungsstelle des Schlundes in den Magen. Die übrigen Teile des Tierkörpers, insbesondere Fleisch und Fett, waren nicht gefärbt.

Bei den Schweinen Nr. 11 u. 17, die mit ganz gefärbtem Eosingerstenschrot gefüttert worden waren, waren der Inhalt und die Schleimhaut des Verdauungskanals in mäßigem Grade rot gefärbt. Es fand sich auch Eosin in der Galle und im Harn. Im übrigen ließ sich aber nirgends eine Anfärbung der Gewebe des Tierkörpers nachweisen.

Ein Unterschied in der Qualität des Fleisches und Fettes des geschlachteten Kontrolleschweines Nr. 23 und der mit Eosingerste gefütterten Schweine Nr. 3 und 6 und Nr. 11 und 17 ließ sich nicht erkennen.

Bei den übrigen Schweinen wurden die Fütterungsversuche fortgesetzt. Das Befinden der Tiere war hierbei dauernd ungetrübt und die Freßlust eine sehr gute. Die tägliche Gewichtszunahme bei den im Versuch verbliebenen Schweinen betrug bis zum 22. Februar 1910 auf den Kopf und Tag berechnet: bei den Schweinen der Gruppe I (5 %ige Eosingerste) 0,79 kg, bei den Schweinen der Gruppe II (ganz gefärbte Gerste) 0,81 kg und bei den Schweinen der Gruppe III (Kontrolletiere) 0,65 kg. Sie war also bei den Versuchstieren sogar größer als bei den Kontrolletieren, obwohl die Tiere vor Beginn des Versuchs so zusammengestellt worden waren, daß jede Gruppe gleich gute Futterverwerter umfaßte (vergl. S. 157).

[1]) Es ist aus jeder Gruppe nur je ein Schwein herausgenommen worden, da die Temperaturen der übrigen Schweine nennenswerte Unterschiede nicht boten.

Bis zum 5. April 1910 betrug die tägliche Gewichtszunahme auf den Kopf bei den Schweinen der Gruppe I 0,70 kg, bei den Schweinen der Gruppe II 0,77 kg, bei den Schweinen der Gruppe III 0,67 kg (vergl. die Kurven und die Tabelle über die Gewichtsschwankungen der Versuchsschweine am Schluß).

Es ist auffallend, daß auch nach Abschluß des dreimonatigen Versuchs bei den Schweinen, die mit ganz gefärbter Eosingerste gefüttert wurden, die höchsten Gewichtszunahmen festzustellen waren, daß hierauf die Schweine folgten, die 5 %ige Eosingerste erhalten haben, und daß erst an letzter Stelle die Kontrolletiere standen.

Besonders auffällig wird dies Ergebnis durch den Ausfall eines am 2. März vorgenommenen Austausches eines Schweines aus der Gruppe II und eines Kontrolletieres.

Das Kontrolleschwein Nr. 22 hatte vom 3. Januar bis zum 1. März eine mäßige tägliche Gewichtszunahme gezeigt, nämlich um 0,53 kg. Vom 2. März an wurde es mit ganz gefärbter Eosingerste gefüttert und hatte nun bis zum 5. April eine tägliche Gewichtszunahme um 0,63 kg, also seit Beginn der Eosinfütterung eine Erhöhung der bisherigen durchschnittlichen täglichen Gewichtszunahme um 0,1 kg.

Das Schwein Nr. 26 hatte vom 3. Januar bis 2. März, während es mit ganz gefärbter Eosingerste gefüttert wurde, eine tägliche Gewichtszunahme von 0,72 kg. Vom 2. März an erhielt das Tier ungefärbte Gerste und zeigte bis zum 5. April nur eine tägliche Gewichtszunahme von 0,56 kg, also nach Aufhören der Eosinfütterung einen Rückgang in der täglichen Gewichtszunahme um 0,16 kg.

Von den Schweinen aus der Gruppe I (Fütterung mit 5 %iger Eosingerste) wurden am 7. April die Tiere mit den Nummern 1 und 7 und von den Schweinen aus der Gruppe II (ganz gefärbte Eosingerste) die Tiere mit den Nummern 9 und 15 geschlachtet. Alle 4 Tiere waren in gutem Nährzustande (vergl. die Kurven und die Tabellen über die Gewichtsschwankungen der Versuchsschweine am Schluß). Während die beiden Schweine, die ganz gefärbte Eosingerste erhalten hatten, eine ausgesprochene Färbung des Inhalts und der Schleimhaut des Verdauungskanals aufwiesen, war bei den beiden Schweinen, die drei Monate lang 5 %ige Eosingerste in der sehr großen täglichen Menge von 2,5 kg auf 50 kg Körpergewicht (in den letzten Wochen etwa 5 kg Gerste pro Tag und Tier) bekommen hatten, nirgends eine Anfärbung zu sehen.

Ferner wurden die drei Kontrollschweine Nr. 18, 19 und 25 geschlachtet. Ein Unterschied in der Beschaffenheit des Fleisches und Fettes der Kontrolleschweine und der mit Eosingerste gefütterten zeigte sich nicht.

Zum Schluß wurden die Fütterungsversuche mit den noch im Bestande verbliebenen 8 Schweinen fortgesetzt, und zwar mit den drei Schweinen Nr. 10, 12 und 16 der Gruppe I, mit den drei Schweinen Nr. 20, 21 und 22[1]) der Gruppe II und den Schweinen Nr. 2 und 26[1]) der Gruppe III. Durch die Schlußversuche, die mit dem Anfang der wärmeren Jahreszeit begannen und bis zum Ende Juni fortgesetzt wurden, sollte festgestellt werden, ob die Aufnahme von Eosin für die Schweine etwa dann

[1]) Die Schweine Nr. 22 und 26 sind am 2. März ausgetauscht worden.

schädlich wirkt, wenn die Tiere möglichst oft und stark der Einwirkung der Sonnenstrahlen ausgesetzt werden. Die Tiere konnten in dieser Zeit fast täglich während der Mittagszeit drei Stunden lang im Freien der Sonnenbestrahlung ausgesetzt werden. In der übrigen Zeit wurden sie in dem gut belichteten Versuchsstalle gehalten.

Da sich die Schweine in den letzten drei Monaten bereits in einem vorgeschritteneren Mastzustande befanden, nahmen sie die anfangs gereichten täglichen Futtermengen von 2,5 kg Gerstenschrot, 1,5 kg Kartoffeln und 1,5 l Magermilch auf 50 kg Körpergewicht nicht mehr vollständig auf; sie verzehrten im Mittel täglich nur 2 kg Gerstenschrot neben einer geringen Beigabe an Kartoffeln und Magermilch auf 50 kg Körpergewicht. Die Tiere fraßen also auch weiterhin das Schrot aus ganz gefärbter Eosingerste ebenso gern wie das Schrot aus ungefärbter Gerste.

Die tägliche Gewichtszunahme betrug vom 5. April bis zum Abschluß der Versuche am 27. und 28. Juni 1910 auf den Kopf bei den Schweinen der Gruppe I (Fütterung mit 5%iger Eosingerste) 0,386 kg, bei den Schweinen der Gruppe II (Fütterung mit ganz gefärbter Eosingerste) 0,444 kg, bei den Schweinen der Gruppe III (Kontrolletiere) 0,366 kg (vergl. die Kurven und die Tabelle über die Gewichtsschwankungen bei den Versuchstieren am Schluß).

Auch jetzt zeigten wieder, wie bei den früheren Versuchen, die mit ganz gefärbter Eosingerste gefütterten Schweine die größte Gewichtszunahme, dann folgten die mit 5%iger Eosingerste gefütterten Schweine, während die Kontrolletiere an letzter Stelle standen.

Die gegenüber dem ersten Versuchszeitraume geringere Gewichtszunahme der Tiere entspricht der Regel, da mit der Zunahme des Mastgrades auch bei gleichbleibender Fütterung der Fett- und Fleischansatz sich stets verringert. Außerdem aber haben die Tiere schließlich, wie schon erwähnt, nicht mehr soviel Gerstenschrot aufgenommen wie zu Beginn der Versuche. Der Mangel jeglicher Krankheitserscheinungen, die andauernd gute Freßlust und die in Anbetracht des vorgeschrittenen Mastzustandes und der verringerten Futteraufnahme immer noch vorzüglichen Gewichtszunahmen sprechen dafür, daß das aufgenommene Eosin auch bei Einwirkung starken Sonnenlichtes unschädlich war.

Die drei mit 5%iger Eosingerste gefütterten Schweine wurden am 28. Juni 1910 geschlachtet. Nirgends konnte bei der sorgfältigsten Besichtigung der Organe, des Muskelfleisches und des Fettgewebes eine Anfärbung durch Eosin aufgefunden werden.

Die drei mit ganz gefärbter Eosingerste gefütterten Schweine und die beiden Kontrolletiere wurden am 27. Juni 1910 geschlachtet. Bei den erstgenannten drei Schweinen waren der Inhalt und die oberflächliche Schicht der Schleimhaut des Verdauungskanals ausgesprochen mit Eosin gefärbt, namentlich im Dickdarm, während die Schleimhaut des Magens und des Dünndarms nur wenig angefärbt war. Alle übrigen Teile, insbesondere Fleisch und Fett, waren von tadelloser Beschaffenheit und unterschieden sich in nichts von den entsprechenden Teilen der Kontrolleschweine. Veränderungen krankhafter Art fanden sich bei keinem der 8 Schweine.

Aus den bei Schweinen angestellten Fütterungsversuchen geht folgendes hervor:

1. Die 6 Monate lang fortgesetzte Fütterung von Schweinen mit Schrot aus zu 5% und ganz gefärbter Eosingerste in so großen Mengen, wie sie im allgemeinen nicht verabreicht werden (4 bis 5 kg täglich auf 100 kg Lebendgewicht), hat weder auf die Gesundheit noch auf die Mastfähigkeit der Tiere noch auf die Güte der Schlachtprodukte nachteilig gewirkt. Lediglich bei den Tieren, die Schrot aus ganz gefärbter Gerste erhalten hatten, war eine Anfärbung der oberflächlichen Schicht des Verdauungskanals festzustellen. Bei den Schweinen, die Schrot aus fünfprozentiger Eosingerste erhalten hatten, wurde auch dieser Befund vermißt.

2. Die Schweine haben das Schrot aus fünfprozentiger und ganz gefärbter Eosingerste stets gerne gefressen.

3. Die Einwirkung starken Sonnenlichts war auf das Versuchsergebnis ohne jeden Einfluß.

B. Versuche an Rindern, Kaninchen, Hühnern und Tauben.

Da es nicht ganz außerhalb des Bereichs der Möglichkeit lag, daß sich Schweine gegenüber dem Eosin anders verhalten als andere Haustiere, so wurden zur Kontrolle der bei Schweinen ausgeführten Versuche in beschränkterem Umfange auch Fütterungsversuche an anderen Tierarten ausgeführt.

1. Versuche an Rindern.

Die Versuche an Rindern konnten aus äußeren Gründen nur an zwei zweijährigen Bullen, die zur Herstellung von Immunseren benutzt wurden, ausgeführt werden. Von den beiden Tieren erhielt das eine in der Zeit vom 24. Januar bis zum 14. Juli 1910 täglich 2 kg Schrot aus 5%iger Eosingerste, das andere dieselbe Menge Schrot aus ganz gefärbter Eosingerste neben Heu und Wasser. Beide Tiere haben während der ganzen Dauer des Versuchs die Eosingerste gern gefressen, ohne irgend eine Krankheitserscheinung zu zeigen.

Von weiteren Versuchen an Rindern ist Abstand genommen, weil dem Gesundheitsamte amtlich bekannt geworden war, daß derartige Versuche von dem hamburgischen Staatstierarzte Prof. Dr. Peter durchgeführt wurden. Diese Versuche haben, wie hier erwähnt werden kann, ebensowenig wie die im Kaiserlichen Gesundheitsamte bei Schweinen und Rindern angestellten einen Anhalt für die Annahme einer schädlichen Wirkung der Verabreichung von Schrot aus Eosingerste ergeben. Es hat sich auch die Vermutung nicht bestätigt, daß das Eosin mit der Milch ausgeschieden werden könnte.

2. Versuche an Kaninchen.

Am 20. Januar 1910 wurden 15 von einem Händler bezogene erwachsene Kaninchen, die bei der Ablieferung einen gesunden Eindruck machten, ohne besondere Auswahl in drei Gruppen zu je fünf Tieren geteilt. Die Gruppe I wurde mit 5%iger Eosingerste, die Gruppe II mit ganz gefärbter Eosingerste, die Gruppe III zur Kon-

trolle mit ungefärbter Gerste gefüttert. Die Tiere fraßen die Eosingerste gern. Einige Tage nach Beginn des Versuchs brach unter den Kaninchen eine seuchenhafte Lungen-Brustfellentzündung aus, die durch ein ovoides Bakterium aus der Gruppe der Bakterien der sogenannten hämorrhagischen Septikämie hervorgerufen wurde. Die mit ungefärbter Gerste gefütterten Kontrolletiere starben sämtlich. Von den 5 Kaninchen, die mit 5%iger Eosingerste gefüttert wurden, starben drei, von den fünf Kaninchen, die ganz gefärbte Eosingerste bekamen, dagegen kein einziges, obwohl auch sie anfänglich leichte Krankheitserscheinungen gezeigt hatten.

Der Versuch wurde mit den überlebenden Kaninchen drei Monate lang fortgeführt. Die Eosingerste wurde von diesen Tieren immer gern aufgenommen.

Das Ergebnis, daß von den Kaninchen, die ganz gefärbte Eosingerste erhielten, keins der Seuche erlegen ist, ist auffallend, zumal da auch die Schweine, die ganz gefärbte Eosingerste bekommen hatten, in den im Kaiserlichen Gesundheitsamte angestellten ebenso wie in den Bromberger Versuchen (siehe Seite 151 und 161) die größte tägliche Gewichtszunahme zeigten. Zunächst kann an einen Zufall gedacht werden. Es ist aber auch nicht auszuschließen, daß bei dem Verhalten der Kaninchen und der Schweine ein Zusammenhang mit der Verabreichung von Eosin bestand. Untersuchungen darüber, in welcher Weise das Eosin die in den Versuchen beobachtete günstige Wirkung bei den Kaninchen gegenüber einer Infektion und bei den Schweinen hinsichtlich der Futterausnützung herbeizuführen vermöchte, haben bis jetzt noch zu keinem Aufschluß geführt. Eine desinfizierende Wirkung des Eosins kann nicht in Frage kommen. Denn sowohl rein wässerige Lösungen von Eosin, als auch solche, die unter Beigabe von 0,5% Salzsäure, entsprechend dem Salzsäuregehalt des Magensaftes, und Lösungen, die unter Zusatz von Alkalien in der Menge, daß die Reaktion derjenigen des Darmsaftes entsprach, hergestellt waren, ließen eine keimtötende oder entwicklungshemmende Wirkung nicht erkennen. Eine solche konnte selbst bei der Einwirkung 20%iger Eosinlösungen auf eine Reihe von Bakterien nicht beobachtet werden. Der Zusatz von Salzsäure und Alkalien in der Menge, wie man diese im Magen- und Darmsaft antrifft, zu den wässerigen Eosinlösungen geschah, um festzustellen, ob diese vielleicht erst bei Gegenwart der im Magen und Darme gegebenen Verhältnisse die Fähigkeit erlangten, zerstörend auf Bakterien einzuwirken. Dies war jedoch, wie erwähnt, nicht der Fall.

3. Versuche an Hühnern und Tauben.

Am 6. Januar 1910 wurden 14 Hühner und 14 Tauben zur Erprobung der Wirkung der mit Eosin gefärbten Gerste in Versuch genommen.

Die Hühner und Tauben wurden wie die Schweine in je drei Gruppen geteilt.

Die Gruppe I bestand aus je 5 Hühnern und Tauben, die außer Wasser nur 5%ige Eosingerste als Futter erhielten.

Die Gruppe II, die ebenfalls je 5 Hühner und Tauben umfaßte, wurde mit ganz gefärbter Eosingerste gefüttert.

Die 4 Hühner und 4 Tauben der Gruppe III waren Kontrolletiere; sie bekamen neben Wasser nur ungefärbte Gerste derselben Herkunft wie die gefärbte als Nahrung.

Alle Tiere wurden in gut belichteten, geräumigen Drahtkäfigen gehalten.

Am 14. Januar wurden bei den Tauben die Federn an der linken Brustwand entfernt, damit die Sonnenstrahlen auf die nackte Haut einwirken konnten.

Sämtliche Hühner und Tauben fraßen ihr Gerstenfutter gut, auch die Hühner und Tauben der Gruppen I und II. Bei den Tieren der Gruppe I war nicht zu beobachten, daß sie etwa die ungefärbten Körner den gefärbten vorzogen. Sie fraßen vielmehr beide Sorten Körner gleich gern.

Sämtliche Hühner und Tauben, auch diejenigen, die mit Eosingerste gefüttert wurden, sind stets gesund geblieben.

Vier Wochen nach dem Beginne der Fütterung mit Eosingerste wurden je 2 Hühner und 2 Tauben aus der Gruppe I und II und je 1 Huhn und 1 Taube aus der Gruppe III geschlachtet. Sie waren alle gut genährt.

Bei den beiden Hühnern und Tauben, die mit ganz gefärbter Eosingerste gefüttert worden waren, war die Schleimhaut des ganzen Verdauungskanals mit Eosin leicht gefärbt; sonst war jedoch nirgends eine Färbung festzustellen.

Bei den beiden Hühnern und Tauben, die 5%ige Eosingerste erhalten hatten, zeigte sich nirgends eine Anfärbung durch Eosin.

Die übrigen Tiere blieben drei Monate lang im Versuche. Sie haben die gefärbte Gerste immer gern gefressen und niemals Gesundheitsstörungen bekundet.

Die Tötung der im Versuche verbliebenen Hühner und Tauben erfolgte am 5. und 6. April 1910.

Bei den 3 Hühnern und Tauben, die drei Monate hindurch mit ganz gefärbter Eosingerste gefüttert worden waren, ist der nämliche Befund erhoben worden wie bei den einen Monat lang mit ganz gefärbter Gerste gefütterten Tieren. Die Schleimhaut des ganzen Verdauungskanals war leicht mit Eosin angefärbt. Sonst war an keiner Körperstelle eine Anfärbung festzustellen. Die 3 Hühner und Tauben, die drei Monate hindurch 5%ige Eosingerste bekommen hatten, ließen nirgends Anfärbung durch Eosin erkennen.

Die Legetätigkeit der 10 Versuchshühner war sehr gering. Dies ist aber nicht auf die Fütterung mit Eosingerste zurückzuführen; denn die 4 Kontrolletiere, die mit ungefärbter Gerste gefüttert worden sind, haben überhaupt keine Eier gelegt. Schlechte Legehühner werden mit Vorliebe verkauft; außerdem ist die Legetätigkeit in der Jahreszeit, in der die geschilderten Versuche ausgeführt wurden (Januar bis Anfang April), an und für sich gering. Hinzu kommt, daß die Tiere dauernd in Verschlägen gehalten wurden und keinen Auslauf hatten, was erfahrungsgemäß die Legetätigkeit herabsetzt. Es konnten nur zwei von den Versuchshühnern gelegte Eier untersucht werden, und zwar von einem Huhne, das 5%ige Eosingerste als Futter erhielt. Eine Anfärbung der Schale und des Inhalts durch Eosin war an den beiden Eiern nicht festzustellen.

Wie unschädlich selbst sehr große Gaben von Eosin für Hühner sind, lehrt folgender Versuch:

Zwei Hühnern im Gewicht von 1200 und 1250 g, die 10 Stunden lang kein Futter gefressen hatten, wurden mit Hilfe eines Spatels je 10 g reines Eosin, also rund $8^1/_3$ g Eosin auf das Kilogramm Körpergewicht, mit etwas Sirup zu einem Brei angerührt, eingegeben. Die ganze Eosinmenge wurde gut aufgenommen. Gesundheitsstörungen traten hiernach bei keinem der Hühner auf.

Die an Geflügel angestellten Versuche haben ergeben, daß

1. einmalige ungewöhnlich große Gaben Eosin ($8^1/_3$ g auf das Kilogramm Körpergewicht) ebenso wie die drei Monate lang fortgesetzte Fütterung mit 5%iger und ganz gefärbter Eosingerste ohne jegliche Störung der Gesundheit vertragen wurde,

2. die Eosingerste stets gerne gefressen wurde,

3. bei den monatelang mit Eosingerste gefütterten Tieren eine Anfärbung von Fleisch und Fett und anderen Körperteilen — abgesehen von der Schleimhaut des Verdauungskanals, die bei den mit ganz gefärbter Gerste gefütterten Tieren angefärbt war — nicht festzustellen war.

Zusammenfassung der Versuchsergebnisse.

Das Gesamtergebnis der an landwirtschaftlich nutzbaren Haustieren ausgeführten Versuche, das in seinen Einzelheiten ausgezeichnet übereinstimmt, läßt sich in folgende Sätze zusammenfassen:

1. Die Fütterung von Haustieren mit Gerste, die zu 5% der Körner mit Eosin angefärbt worden ist, hat keinerlei Nachteile im Gefolge. Diese Gerste wird ebenso gerne gefressen wie ungefärbte Gerste und erzeugt weder Erscheinungen einer Krankheit noch Störungen der Futterausnutzung noch Veränderungen am Fleische und Fette oder an anderen Teilen des Tierkörpers.

2. Man kann an Haustiere selbst mit Eosin ganz gefärbte Gerste und reines Eosin in Mengen, die das Hundert- und Tausendfache dessen betragen, was im höchsten Falle bei der Verfütterung der mit Eosin denaturierten Gerste aufgenommen werden kann, verabreichen, ohne daß eine Störung der Gesundheit auftritt.

Hierzu 4 Anlagen:

a) Tabelle I. Gewichtsschwankungen der Schweine nach Einstellung in die Versuche.

b) Tabelle II. Untersuchung von Blut, Harn und Galle auf Eosin.

c) Gewichtskurven.

d) Temperaturkurven.

Tabelle I. Gewichtsschwankungen der

Datum der Wägungen 1910	Schweine, die reines Eosin erhalten haben					Gruppe I (5%ige Eosingerste)						
	Nummern der											
	4	8	13	24	5	1	3	6	7	10	12	16
	Gewicht in											
3. 1.	60,2	63,5	60,4	55,6	55,2	73,5	61,2	58,5	58,5	65,1	62,1	66,9
7. 1.	—	60,0	54,2	52,6	58,7	78,2	62,4	62,5	63,8	64,4	64,6	67,2
9. 1.	—	—	61,2	—	—	—	63,8	—	—	—	—	—
11. 1.	—	63,0	—	57,6	64,5	80,0	—	66,6	67,6	69,6	68,5	70,8
18. 1.	—	70,2	—	61,1	71,1	86,0	—	—	75,0	73,1	75,8	73,6
25. 1.	—	76,2	—	71,2	79,7	93,5	—	—	80,7	81,0	80,7	80,0
1. 2.	—	80,6	—	76,1	87,1	96,2	—	—	88,7	84,6	79,2	86,7
8. 2.	—	84,2	—	77,5	98,5	98,8	—	—	96,8	89,0	85,3	90,2
15. 2.	—	91,5	—	87,2	104,2	105,0	—	—	102,7	95,8	93,4	94,2
22. 2.	—	95,0	—	91,5	111,0	107,2	—	—	109,0	101,3	102,7	103,1
1. 3.	—	98,3	—	91,8	117,2	110,5	—	—	110,9	102,8	95,9	102,2
8. 3.	—	—	—	97,3	—	116,7	—	—	116,0	110,8	105,7	104,3
15. 3.	—	—	—	105,5	—	114,5	—	—	122,2	114,7	112,5	111,5
22. 3.	—	—	—	108,0	—	122,7	—	—	131,0	120,2	119,7	115,0
29. 3.	—	—	—	110,7	—	127,8	—	—	135,2	127,0	115,0	119,0
5. 4.	—	—	—	120,5	—	129,5	—	—	138,5	128,5	124,5	125,0
12. 4.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	135,0	128,0	125,0
19. 4.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	141,0	130,7	132,7
26. 4.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	142,5	137,5	135,0
3. 5.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	144,2	143,2	134,2
10. 5.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	147,5	146,7	137,5
17. 5.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	147,2	140,7	143,7
24. 5.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	151,7	148,2	141,2
31. 5.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	158,5	155,5	147,0
7. 6.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	157,5	151,8	148,5
14. 6.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	161,0	162,7	145,5
21. 6.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	163,2	162,0	145,7
27. 6.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	162,0	162,0	150,0

Anmerkung * = Die Schweine wurden am 2. März miteinander vertauscht, um zu ermitteln, ob die sehr guten Gewichtszunahmen bei den Schweinen der Gruppe II auf einem besonders

Tabelle II. Untersuchung von Blut,

Nr.		Wurde gefüttert mit?	Untersucht wurden?	Datum 1910	Ergebnis
1	Schwein Nr. 4	300 g Eosin	Blutserum	7. Januar	Im Blutserum kein Eosin nachweisbar.
			Harn u. Galle	„	Starke Fluoreszenz in Harn und Galle. Hier war also Eosin vorhanden.
2	Schwein Nr. 8	1600 g Eosin in 55 Tagen	Blutserum	11. Januar	Kein Eosin nachweisbar.
			Galle	„	} Eosin nachweisbar.
			Harn	„	

Schweine nach Einstellung in die Versuche.

Gruppe II (vollständig gefärbte Eosingerste)							Gruppe III (Kontrolletiere)					
Schweine												
9	11	15	17	20	21	26*	2	18	19	22*	23	25
Kilogramm												
54,0	62,7	71,2	63,3	68,7	61,9	67,0	67,0	68,3	67,0	62,0	58,0	57,6
55,4	65,2	73,8	63,9	69,2	64,8	69,5	69,0	71,5	70,9	65,0	63,0	62,9
—	—	—	60,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
58,6	71,2	80,6	—	73,2	69,2	70,7	71,5	72,6	72,0	66,9	62,1	63,6
60,2	—	87,7	—	78,7	75,3	78,8	74,8	79,1	80,2	72,0	—	69,1
62,2	—	95,0	—	87,2	80,2	84,2	78,7	83,2	85,7	74,6	—	73,8
68,5	—	103,2	—	97,5	84,4	87,5	82,3	89,3	86,1	82,2	—	81,5
72,4	—	111,2	—	99,0	87,5	94,0	90,0	96,8	96,8	83,0	—	85,7
74,5	—	117,8	—	103,7	92,3	101,5	93,1	103,8	100,3	83,8	—	89,7
79,7	—	127,0	—	113,5	100,7	105,0	90,9	108,0	98,7	89,7	—	97,0
85,8	—	132,0	—	117,8	103,5	107,8	100,0	110,7	108,7	92,1	—	98,5
86,7	—	137,5	—	117,8	108,8	*110,5*	103,8	117,8	116,2	*90,0*	—	102,0
95,3	—	146,8	—	126,5	113,7	*113,2*	105,3	115,8	113,0	*99,2*	—	108,5
101,0	—	150,5	—	129,7	118,0	*120,0*	115,0	129,0	125,5	*107,2*	—	107,2
101,0	—	158,2	—	133,0	121,0	*126,7*	117,2	135,2	129,0	*105,0*	—	116,5
108,5	—	163,5	—	141,5	125,5	*127,0*	120,5	134,0	128,0	*113,5*	—	123,5
—	—	—	—	139,5	127,5	*134,5*	127,0	137,0	135,0	*115,5*	—	122,0
—	—	—	—	145,5	133,0	*138,2*	128,2	—	—	*120,2*	—	—
—	—	—	—	151,7	135,7	*137,7*	130,0	—	—	*125,0*	—	—
—	—	—	—	152,0	133,5	*142,7*	138,2	—	—	*120,0*	—	—
—	—	—	—	155,8	140,0	*148,5*	136,5	—	—	*125,8*	—	—
—	—	—	—	164,0	142,0	*148,7*	141,0	—	—	*131,7*	—	—
—	—	—	—	162,5	145,5	*151,7*	144,7	—	—	*128,5*	—	—
—	—	—	—	171,2	155,2	*157,2*	145,0	—	—	*140,2*	—	—
—	—	—	—	177,2	151,7	*155,1*	153,5	—	—	*144,7*	—	—
—	—	—	—	172,0	154,0	*154,5*	155,0	—	—	*142,0*	—	—
—	—	—	—	179,0	160,2	*152,2*	156,7	—	—	*147,2*	—	—
—	—	—	—	182,0	159,0	*150,0*	158,2	—	—	*150,0*	—	—

guten Futterverwertungsvermögen dieser Tiere beruhte oder mit der Verabreichung der vollständig gefärbten Eosingerste zusammenhing.

Harn und Galle auf Eosin.

Nr.		Wurde gefüttert mit?	Untersucht wurden	Datum 1910	Ergebnis
3	Schwein Nr. 13	240 g Eosin	Blutserum Galle	10. Januar „	Kein Eosin nachweisbar. Eosin vorhanden.
4	Schwein Nr. 24	3000 g Eosin in 85 Tagen	Blutserum Harn	7. April 10. März	Kein Eosin. Eosin nachweisbar.
5	Schwein Nr. 5	1800 g Eosin in 50 Tagen	Blutserum Galle	4. März „	Kein Eosin nachweisbar. Eosin vorhanden.

Nr.		Wurde gefüttert mit?	Untersucht wurden	Datum 1910	Ergebnis
6	Schwein Nr. 1	5%ige Eosingerste	Blutserum	13. Januar	Kein Eosin.
			„	25. „	
			„	7. April	
			Galle	„	Eosin vorhanden.
7	Schwein Nr. 3	Desgl.	Blutserum	10. Januar	Kein Eosin.
			Galle	„	
			Harn	„	
8	Schwein Nr. 6	Desgl.	Blutserum	11. Januar	Kein Eosin.
			Harn	„	
			Galle	„	Absorptionsstreifen des Eosins deutlich.
9	Schwein Nr. 7	Desgl.	Blutserum	13. Januar	Kein Eosin.
			„	7. April	
			Galle	„	Eosin vorhanden.
10	Schwein Nr. 10	Desgl.	Blutserum	11. Januar	Kein Eosin.
			„	25. „	
			„	27. Juni	
			Harn	11. März	
			„	23. „	
11	Schwein Nr. 12	Desgl.	Blutserum	25. Januar	Kein Eosin.
			„	1. Februar	
			„	27. Juni	
12	Schwein Nr. 16	Desgl.	Blutserum	25. Januar	Kein Eosin.
			„	10. März	
			„	27. Juni	
			Harn	10. März	Kein Eosin.
13	Schwein Nr. 9	Ganz gefärbte Gerste	Blutserum	15. Januar	Kein Eosin.
			„	7. April	
			Galle	„	Eosin vorhanden.
14	Schwein Nr. 11	Desgl.	Blutserum	11. Januar	Kein Eosin.
			Galle	„	Eosin vorhanden.
			Harn	„	
15	Schwein Nr. 15	Ganz gefärbte Gerste	Blutserum	15. Januar	Kein Eosin.
			„	25. „	
			Harn	7. April	
			„	„	Eosin vorhanden.
16	Schwein Nr. 17	Desgl.	Blutserum	9. Januar	Kein Eosin.
			Galle	„	Eosin vorhanden.
17	Schwein Nr. 20	Desgl.	Blutserum	25. Januar	Spuren von Eosin vorhanden[1]).
			„	23. März	Kein Eosin.
			Galle, Harn	27. Juni	
					In Galle und Harn Eosin vorhanden.
18	Schwein Nr. 21	Desgl.	Blutserum	25. Januar	Kein Eosin.
			„	27. Juni	
			Harn	11. März	Eosin vorhanden.
			Harn u. Galle	27. Juni	
19	Schwein Nr. 26	Desgl.	Blutserum	1. Februar	Kein Eosin.

[1]) Diese Spuren dürften auf eine Verunreinigung mit kleinsten Mengen Eosin zurückzuführen sein, die einmal vorkommen kann trotz eingehaltener peinlichster Vorsichtsmaßregel.

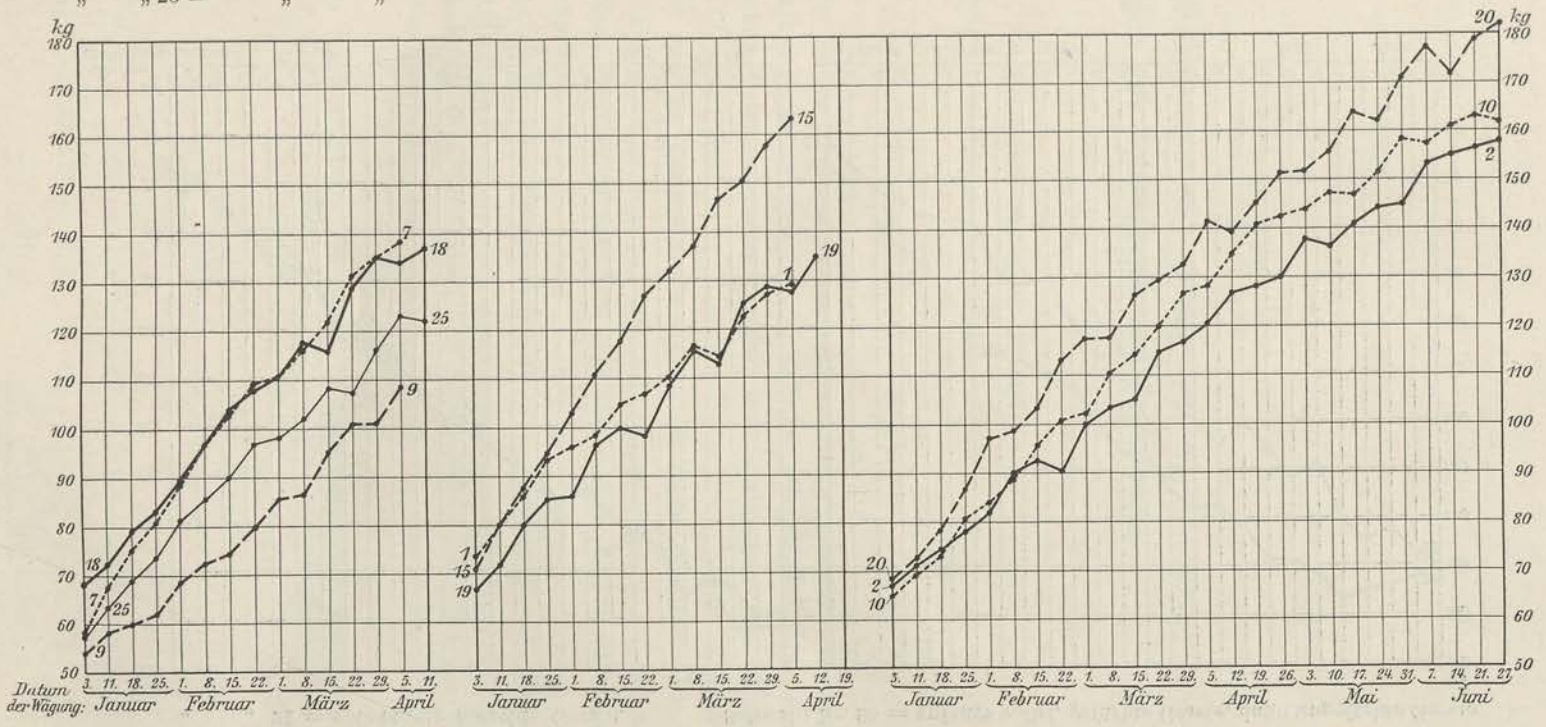
c) Gewichtskurven.

..... = Fütterung mit Schrot aus 5 % iger Eosingerste.
– – – – – = „ „ „ „ vollständig gefärbter Gerste.
——— = „ „ „ „ ungefärbter Gerste.

Schwein Nr. 7 = 5 % ige Eosingerste.
„ „ 9 = vollständig gefärbte Gerste.
„ „ 18 = ungefärbte Gerste.
„ „ 25 = „ „

Schwein Nr. 1 = 5 % ige Eosingerste.
„ „ 15 = vollständig gefärbte Gerste.
„ „ 19 = ungefärbte Gerste.

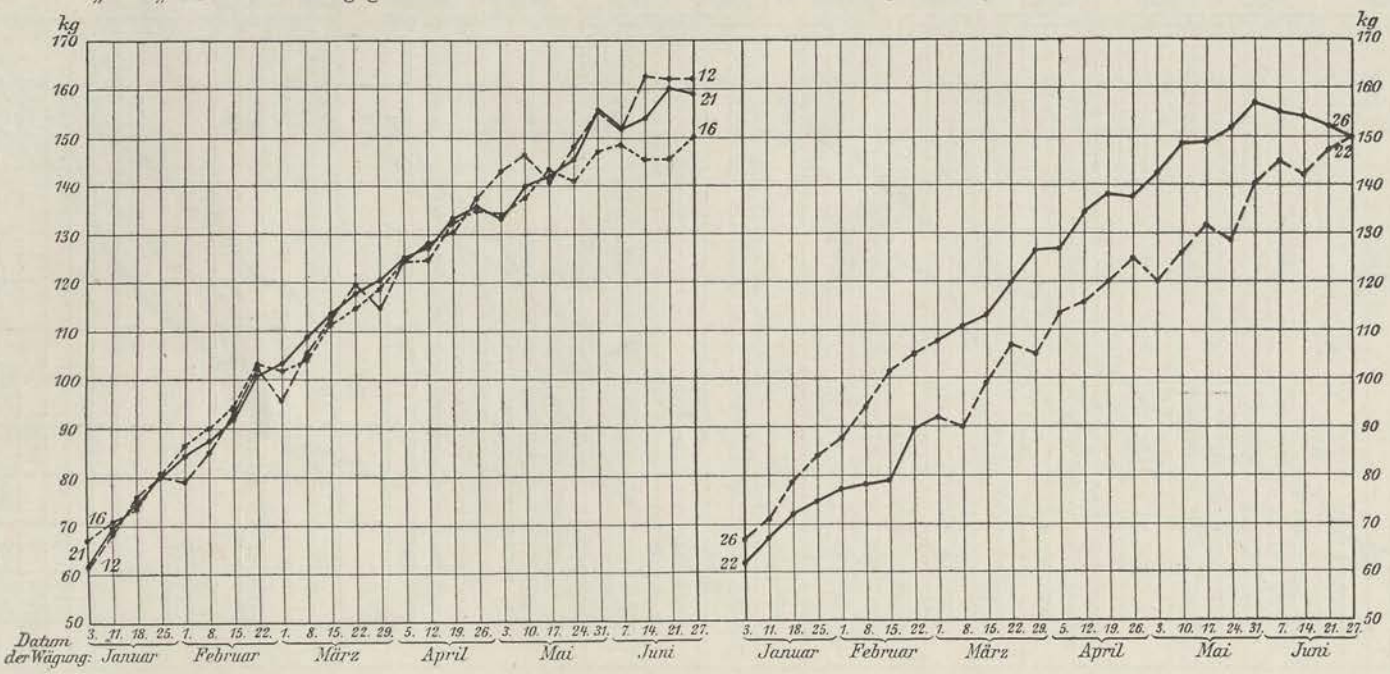
Schwein Nr. 10 = 5 % ige Eosingerste.
„ „ 20 = vollständig gefärbte Gerste.
„ „ 2 = ungefärbte Gerste.



c) Gewichtskurven.

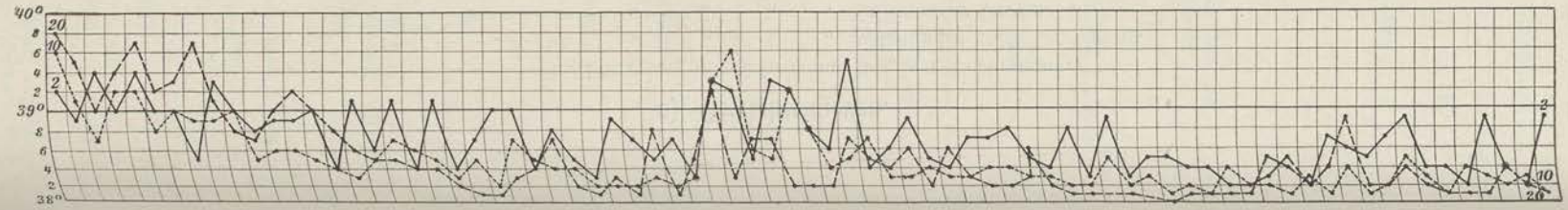
Schwein Nr. 12 = 5 %ige Eosingerste.
„ „ 16 = „ „
„ „ 21 = vollständig gefärbte Gerste.

Schwein Nr. 22 = anfangs ungefärbte Gerste, dann vollständig gefärbte Gerste.
Schwein Nr. 26 = anfangs vollst. gefärbte Gerste, dann ungefärbte Gerste.



d) Temperaturkurven.

Morgentemperaturen der Schweine Nr. 2 (Kontrolletier), Nr. 10 (5 %ige Eosingerste) und Nr. 20 (gänzlich gefärbte Eosingerste) vom 31. Dezember 1909 bis zum 16. März 1910. Vergl. S. 159.



II. Teil.

Pharmakologische Untersuchung des Eosins, mit Berücksichtigung der Wirkungen des Fluoreszeins und Erythrosins.

Von

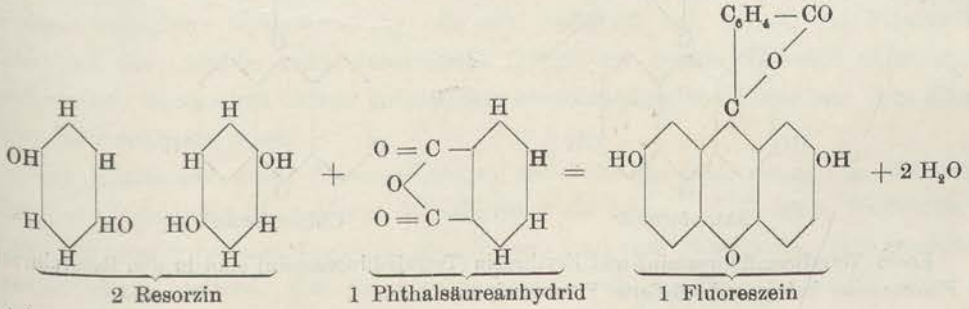
Regierungsrat **Dr. med. E. Rost,**
Mitglied des Kaiserlichen Gesundheitsamts.

I. Einleitung.

Zusammen mit den vorbeschriebenen Versuchen an landwirtschaftlichen Nutztieren sollen die nachstehend geschilderten im Kaiserlichen Gesundheitsamte ausgeführten pharmakologischen Untersuchungen ein Bild der Wirkungsart des Eosins geben. Eine erschöpfende, auch Einzelfragen klärende Untersuchung war allerdings nicht beabsichtigt, zumal sich im Verlauf der Versuche die außerordentlich geringe Wirksamkeit des Eosins auf das Tier herausstellte und hauptsächlich nur noch die Vergleichung des Verhaltens des Eosins mit dem des Fluoreszeins und Erythrosins wesentliches Interesse erweckte.

Bisher sind die Phthaleine oder Pyroninfarbstoffe Fluoreszein[1]) und dessen Brom- und Jodsubstitutionsprodukte Eosin (Tetrabromfluoreszein) und Erythrosin (Tetrajodfluoreszein) hinsichtlich ihrer Wirkungen auf den tierischen und menschlichen Organismus nach folgenden Richtungen untersucht worden:

[1]) Dieses Derivat des Triphenylmethans entsteht durch Kondensation von Phthalsäureanhydrid und Resorzin. Der Vorgang kann durch folgende Gleichung veranschaulicht werden:

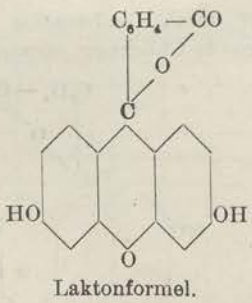


1. Es sind die Verwandtschaftsbeziehungen dieser Farbstoffe zu den verschiedenen Geweben des Körpers und mit Hilfe der färbenden und fluoreszierenden Eigenschaften die Gesetze verfolgt worden, nach denen sich diese Stoffe im Körper verteilen. Nach Ehrlichs grundlegenden Untersuchungen über die Verteilung von Farbstoffen im tierischen Organismus gehört die Muttersubstanz des Eosins, das Fluoreszein, zu jenen Farbstoffen, die sich leicht in den Säften verbreiten, zeigt aber wie andere saure Farbstoffe die Eigentümlichkeit, von der grauen Hirnsubstanz und ebenso vom Fettgewebe nicht aufgenommen zu werden; Fluoreszein ist ebenso wie das Eosin nicht neuro- und liprotrop. Später hat dann Overton bei seinen Studien über den Mechanismus der Aufnahme von Farbstoffen durch die Pflanzen- und Tierzelle gezeigt, daß die Farbstoffe der Fluoreszeingruppe sich in den Gehirnsubstanzen Protagon und Cerebrin nicht lösen; er prüfte die Aufnahmefähigkeit dieser beiden Verbindungen für zahlreiche Farbstoffe und fand, daß Eosin von Protagon nicht und von Cerebrin nur schwach gespeichert wird, während Erythrosin aus seiner Lösung von keiner der beiden Verbindungen herausgelöst wurde. Die Aufnahmefähigkeit zeigte sich abhängig von dem Verhältnis der Löslichkeit der untersuchten (sauren und basischen) Farbstoffe in den Gehirnlipoiden zu der Löslichkeit in den Körperflüssigkeiten, d. h. von dem Teilungskoeffizienten, der ihre Verteilung in einem Gemisch von Olivenöl und Wasser bestimmt. Dieser Teilungskoeffizient zwischen Öl und Wasser ist für die basischen Farbstoffe groß, dementsprechend dringen diese leicht in die Zellen ein, dagegen niedrig für die sauren Farbstoffe; dementsprechend finden diese im Organismus nicht die Vorbedingung für die Aufnahme in die Zellen. Auch in die lipoidreichen lebenden roten Blutkörperchen dringt Eosin nur in äußerst geringem Maße ein. Nach Jodlbauers und Buscks Untersuchungen an Kaninchen und Hunden sind auch die Epidermiszellen wie überhaupt die Haut in ungeschädigtem Zustand kaum durchdringlich für die genannten Stoffe, während sie nach vorausgegangener Verletzung (z. B. bei der subkutanen Injektion) oder im kranken Zustand (z. B. Krebserkrankung) bei unmittelbarer Berührung oder nach Schädigung z. B. durch intensive Behandlung mit Kalziumsulfhydrat, auch bei Einspritzung des Eosins ins Blut sie reichlich aufnehmen. Die gleiche Aufnahmefähigkeit zeigen Epitheldefekte

---

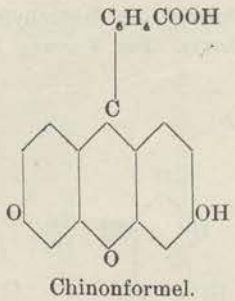
Dem Fluoreszein wird die Konstitutionsformel I und neuerdings die Formel II zugeschrieben:

I



Laktonformel.

II



Chinonformel.

Eosin (Tetrabromfluoreszein) und Erythrosin (Tetrajodfluoreszein) sind in den Resorzinresten des Fluoreszeins halogensubstituierte Fluoreszeine.

der Hornhaut und der Bindehaut des Auges. E. Cooke und L. Loeb, die die Giftigkeit von Eosin, Methylenblau, Neutralrot, Thionin und Bismarckbraun an den Eiern des Seesterns Asterias und des marinen Fisches Fundulus untersuchten und die Wirksamkeit in Vergleich setzten mit der Fähigkeit, in die Gewebe einzudringen und sie zu färben, fanden, daß Eosin unter den untersuchten Farbstoffen die geringste Giftigkeit aufweist; der verschiedene Grad der Wirksamkeit des Eosins auf Asterias- und auf Funduluseier geht parallel mit dem Vermögen, in die Zellen des Embryos und in den Dottersack einzudringen. Da der Embryo im Fundulusei von einer widerstandsfähigen äußeren Schale umgeben ist, ist für ihn das Eosin besonders wenig giftig, da es nicht in die Gewebe eindringt. Auch in diesen Versuchen färbte das Eosin nur das abgestorbene Zellprotoplasma. Mit Hilfe des elektrischen Stroms (Iontophorese) läßt sich diese Aufnahmefähigkeit der Zellschichten der Haut beträchtlich steigern.

Das Fluoreszein ist ebenso wie das Eosin bei Einspritzung in das Blut und unter die Haut und bei Zufuhr sehr großer Mengen in den Magen in den Körperflüssigkeiten nachgewiesen worden, so Fluoreszein im Speichel, ferner im Kammerwasser des gesunden Kaninchenauges bei subkutaner Einspritzung und des intraokular kranken Auges des Menschen bei innerlicher Darreichung (Ehrlich, Wessely, Hamburger, Burk, Fehr), so Eosin in der Galle. In die Milch gehen diese Farbstoffe nach den bisherigen Untersuchungen nicht über; auch in den Schweiß nicht, wenigstens hat Wessely Fluoreszein darin nicht auffinden können. Im Fruchtwasser und in den Embryonen fand Richter bei seinen Versuchen an tragenden Kaninchen kein Eosin. In dem auswählenden Übertritt in die Körperflüssigkeiten unterscheiden sich diese Farbstoffe wesentlich von andern leicht löslichen, aber anorganischen Verbindungen, wie der Borsäure und ihren Salzen und wie den Alkalijodiden, die in alle Sekrete, auch in die Milch und den Schweiß, übergehen. Im Gegensatz zu diesen leicht diffundierenden Stoffen, die so gut wie vollständig aus dem Verdauungskanal in den Kreislauf übergehen, werden Eosin und die verwandten Farbstoffe nur zum Teil von den Epithelien des Darms aufgesaugt (Jodlbauer).

Dieser geringe resorbierte Anteil läßt sich in der Regel im Blut nicht nachweisen, wohl aber genügt er vielfach, um dem Harn eine insbesondere bei der von Richard Meyer und von Jodlbauer angewendeten fokalen Sonnenlichtbeleuchtung erkennbare, deutlich von der normalen Fluoreszenz des Harns verschiedene Grünfluoreszenz zu verleihen. Die bei Einspritzung von Fluoreszein und seinen Substitutionsprodukten ins Blut, in die Bauchhöhle und unter die Haut und bei Einführung größerer Mengen in den Magen auftretende Färbung der Haut und Schleimhäute ist nur eine scheinbare Gewebsfärbung; sie tritt lediglich auf, sobald das Plasma des Blutes und der Lymphe einen bestimmten Gehalt an diesem Farbstoff aufweist, sie verschwindet, wenn diese Grenze infolge der Ausscheidung von Eosin aus dem Körper wieder unterschritten wird.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind für die Beurteilung der Wirkungsweise des Eosins von besonderer Wichtigkeit; sie lehren, daß diese Farbstoffe zu keinem Körpergewebe, am wenigsten zum Nerven- und zum Fettgewebe, eine spezifische Verwandtschaft besitzen, daß sie aber in die Gewebe eindringen, sobald diese ge-

schädigt sind oder absterben, und daß die Färbekraft des Eosins so groß ist, daß sie von den Blutgefäßen aus den Geweben, die sie durchsetzen, eine Färbung verleihen können.

2. Es sind die in Rede stehenden Farbstoffe auf ihre Wirkungen auf den Organismus bei Einführung auf verschiedenen Wegen, auch im Hinblick auf etwa bei der Fabrikation und beim Hantieren mit ihnen auftretende Schädigungen als Fabrikgift und auf ihr Verhalten im Organismus geprüft worden. Neuerdings wurden diese Stoffe eingehend in ihrer Wirkung auf höhere und niedere Tiere, auf Bakterien, Enzyme und auf isolierte Organe als typische sensibilisierende oder photodynamische Stoffe untersucht, d. h. als Verbindungen, die bei Gegenwart von Sonnenlicht und Sauerstoff eine erhöhte Giftigkeit zeigen bezw. den Ablauf der Wirkungen einzelner anderer Gifte zu steigern vermögen.

Schon 1880 hat Grandhomme die zum Färben von Gerste benutzten Stoffe Eosin und Erythrosin längere Zeit hindurch an Kaninchen verfüttert. 2 Tiere, die innerhalb 10 Tagen 2 g und darauf innerhalb 8 Tagen 5 g Eosin erhielten, zeigten ebensowenig wie 3 Kaninchen, an die 5 g Erythrosin verfüttert worden waren, irgendwelche Störungen des Befindens. Ebenso hat Ehrlich 1882 das Fluoreszein-Ammoniak (Uranin) bei seinen Untersuchungen über provozierte Fluoreszenzerscheinungen am Auge von Kaninchen als praktisch ungiftig erwiesen. Obwohl er „häufig kolossale Dosen anwendete und derartige Versuche öfters bei demselben Tiere anstellte", hat er nie „eine toxische oder nachteilige Wirkung" beobachtet. Weitere Versuche hat sodann Richter angestellt, der Tieren (Kaninchen und Hunden) auf verschiedenen Wegen (Blutbahn, Unterhautzellgewebe, Bauchhöhle, Rückenmarkskanal, Luftröhre) Eosin in Lösung oder in Substanz beibrachte. Einspritzungen verdünnter Lösungen ($^1/_2$ %ig, 10 ccm) ins Blut vertrugen die Tiere ohne jede Störung; auch in den Fällen, wo Kaninchen infolge gewaltsamer Einführung großer Mengen Eosin, z. B. in die Luftröhre, starben, traten keinerlei charakteristische Vergiftungserscheinungen ein. Die umfassendsten Untersuchungen rühren von Jodlbauer und Busck her; aber auch sie konnten keine ausgeprägte Wirksamkeit des Eosins feststellen. Sie[1]) haben u. a. an einen etwa 8 kg schweren Hund während 4 bis 5 Wochen jeden zweiten bis dritten Tag 0,1 g Eosin verfüttert, ohne daß irgendwelche Erscheinungen auftraten. Vorher haben schon Le Goff und Sainton Versuche an Hunden angestellt. Einem 10 kg schweren Tiere waren innerhalb weniger Tage im ganzen 11 g Eosin in 25%iger Lösung subkutan eingespritzt worden; Kot und Harn waren eosinrot gefärbt. Ein anderer Hund von 11,5 kg Gewicht erhielt anfänglich Eosin in den Magen, sodann unter die Haut gespritzt; größere Mengen wurden erbrochen; im ganzen wurden dem Tier 96 g zugeführt, ohne daß besondere Erscheinungen sich eingestellt hätten; bei der Sektion fluoreszierte der Inhalt der vorderen Augenkammer. Kastle schließt aus dem Ergebnis eines einzigen Versuchs an einem Meerschweinchen (455 g Gewicht, 0,5 g Fluoreszein in Wassser aufgeschwemmt, in die Bauchhöhle. Prostration, Neigung zu Krampfbewegungen, Tod nach 105 Minuten; Grünfärbung der Gewebe und Organe;

[1]) Private Mitteilung Jodlbauers an den Verf.

Fluoreszein im Auge, ausgenommen in der Linse), daß Fluoreszein ausgesprochen giftig sei.

Ebenso wie keine Allgemeinwirkungen des Eosins bekannt geworden sind, kommen ihm und den chemisch verwandten Farbstoffen keine ausgeprägten örtlichen Reizwirkungen zu. Aus Alfred Vogts zur Aufklärung zahlreicher bei Arbeitern in Schweizer Farbenfabriken beobachteter Augenschädigungen angestellten Untersuchungen über die Reizwirkungen von Farbstoffen sauerer, basischer und salzartiger Natur, die er am Kaninchenauge mittels Einbringung der Farbstoffe in Substanz in den Bindehautsack vornahm, ergibt sich, daß wohl alle basischen Farbstoffe mehr oder weniger intensive Reizwirkungen auf die Hornhaut des Auges und die Bindehaut entfalten, nicht aber die sauren. Mit dieser Methode, die sich auch bei der Prüfung der modernen Lokalanästhetika bewährt hat, geprüft zeigte Eosin, ebenso wie Fluoreszein und Erythrosin, keinerlei Reizerscheinungen. Ebenso erwies sich das chlorsubstituierte Eosin, das Phloxin (Tetrabromdichlorfluoreszein)[1]) und das chlorsubstituierte Erythrosin, Rose bengale B (Tetrajoddichlorfluoreszein)[1]), ohne örtliche Schadenwirkungen. Auch eine antibakterielle Wirksamkeit ist diesen Farbstoffen nicht eigen, wie dies Beckh und Penzoldt für Eosin und Rose bengale (Tetrajodtetrachlorfluoreszein)[1]) nachgewiesen haben; den basischen Farbstoffen kommen dagegen antibakterielle Wirkungen zu. Also dürfte auch das Fehlen örtlicher Reizwirkungen und antibakterieller Eigenschaften mit der Natur des Eosins und der genannten Phthaleine oder Pyroninfarbstoffe als saure Farbstoffe, die keine oder nur schwach ausgeprägte Affinitäten zu den Geweben haben, zusammenhängen.

Die interessanten Versuche von Tappeiners, Jodlbauers und Straubs über Photodynamie der fluoreszierenden Stoffe haben nun neuerdings gezeigt, daß die Wirkungen des Fluoreszeins und seiner fluoreszierenden Derivate im Sonnenlicht und bei Gegenwart von Sauerstoff bei einzelligen Lebewesen, aber auch bei höher entwickelten Organismen intensiver verlaufen bezw. andere sein können als im Dunkeln. Fische, die in Lösungen dieser Farbstoffe schwammen, wiesen eine viel intensivere Abstoßung von Epithel an den Flossen auf, wenn sie dem Licht ausgesetzt waren, als wenn sie im Dunkeln gehalten wurden. Mäuse erlitten bei subkutaner Einführung dieser Stoffe Nekrose der Ohren, partiellen Haarausfall an Kopf und Rücken mit oder ohne Hautnekrose. Trotzdem ist aber auch unter diesen Bedingungen die Giftigkeit des genannten Farbstoffs noch sehr gering. Bei innerlicher Einführung an Versuchstiere stellten sich entsprechende nekrotische Erscheinungen an der Haut nicht ein.

3. Es ist im besonderen untersucht worden, ob das Brom in organischer Bindung enthaltende Eosin sich therapeutisch beim Menschen mit Erfolg als organische Bromverbindung in der Behandlung der Epilepsie verwenden ließe.

Einschlägige Versuche scheinen allein in Pariser Krankenhäusern angestellt worden zu sein. Le Goff und Sainton ließen zwei Epileptiker Mengen von 0,1 g bis 2 g Eosin einnehmen, ohne daß Störungen sich geltend machten. Prime hat

[1]) Die Chloratome sind in den Phthalsäurerest des Fluoreszeinmoleküls eingetreten.

über die Ergebnisse der Behandlung von 26 männlichen Epilepsiekranken mit Eosinnatrium (Bromgehalt etwa 40%) berichtet, die er aber nur zum Teil selbst hat beobachten können. Die Kranken erhielten Eosin, und zwar täglich in wöchentlich nach folgender Skala steigenden Mengen: 0,25, 0,50, 0,75, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5 g. Nach 6 Wochen bis 2 Monate betragender Behandlung traten Erkrankungen ein, die sich fast ausschließlich auf die äußere Haut beschränkten; außerdem war in einer kleinen Zahl von Fällen auch die Mundschleimhaut ergriffen. Die befallenen Hautstellen waren sämtlich dem Lichte ausgesetzte Körperteile: Gesicht, Hals, oberer Teil der Brust, Hände; die Erkrankung bestand in Rötung und schmerzloser und nicht ödematöser Schwellung. Im Verlaufe der Erkrankung traten schon auf geringfügige Verletzungen durch Kratzen usw. Ulzerationen ein; auch wurde Abfallen der Nägel an den Fingern, insbesondere am Daumen beobachtet; die Nägel der Zehen blieben frei. Keinerlei Anzeichen wiesen auf Allgemeinerkrankungen hin.

Die genannten Störungen sind nach Tappeiners und nach Jodlbauers Auffassung unzweifelhafte Eosinwirkungen, die durch Licht bei Sauerstoffgegenwart an den mit Eosin innerlich behandelten Kranken hervorgerufen worden sind analog den Hautwirkungen an belichteten Tieren nach subkutaner Zuführung des Eosins; mit chronischer Bromvergiftung haben sie nichts gemein. Die zur Erzeugung solcher örtlicher Reizwirkungen erforderlich gewesenen täglichen Eosinmengen betrugen 2,5 bis 3,0 g; Gaben unter 2 g Eosin haben solche Erscheinungen niemals hervorgerufen.

Auch sonst hat man zahlreiche Erfahrungen an Menschen, denen Fluoreszein zu diagnostischen Zwecken (Erkennung bestehender oder abgeheilter entzündlicher Prozesse im Auge) innerlich gegeben wird, sammeln können, aus denen hervorgeht, daß eine einmalige Gabe von mehreren Grammen Uranin wohl eine sehr schnell eintretende und rasch vorübergehende ikterische Färbung der Haut und der Schleimhäute, sowie bei Störungen der intraokularen Zirkulation eine deutliche Fluoreszenz des Kammerwassers hervorruft, aber unschädlich ist; bei Kindern wurden 1,5 bis 2 g, bei Erwachsenen 3 bis 6, ja sogar 15 g angewandt (Hamburger, Burk, Fehr), schon 1882 hat Ehrlich 1,5 g Uranin als völlig unbedenklich empfohlen.

II. Eigene Versuche.

Zur Verwendung kamen Präparate der Farbwerke vorm. Meister, Lucius & Brüning in Höchst a. M., die dem Gesundheitsamte durch Vermittelung des Reichsschatzamts zugestellt wurden, und zwar Eosin Extra G. F. salzfrei (Eosin-Kalium), Fluoreszein (Fluoreszein-Natrium) und Erythrosin (Erythrosin-Natrium A. G. neu). Zu einzelnen Versuchen wurde — wie dies besonders vermerkt ist — Eosin-Natrium verwendet.

Um den Giftigkeitsgrad des Eosins an einer Tierart möglichst genau zu bestimmen, wurden zunächst Versuche an Meerschweinchen angestellt.

1. Versuche an Meerschweinchen.

Tabelle 1. Versuche zur Bestimmung der tödlichen Dosis des Eosins bei Meerschweinchen.

Einführung in den Magen. Verwendung 20 und 50 %iger Lösungen.
(Die Versuchstiere wurden etwa 24 Stunden vor Beginn des Versuchs ohne Nahrung gelassen.)

Laufende Nr.	Datum des Versuchs	Gewicht der Tiere in g	Eingeführte Menge Eosin: pro Kilogramm Körpergewicht berechnet g	Eingeführte Menge Eosin: tatsächlich eingeführte Menge, mit der Schlundsonde eingeführt g	Konzentration der eingeführten Lösung %	Die Tiere starben: innerhalb 24 Stdn.	Die Tiere starben: innerhalb von Tagen	Bemerkungen
1	4. 6.	420	6	rund 2,5	20	†	—	Tod nach 87 Minuten
2	4. 6.	380	6	„ 2,3	50	†	—	„ „ 126 „
3	4. 6.	360	5	„ 1,8	20	†	—	„ zwischen 7½ u. 19 Std.
4	4. 6.	350	5	„ 1,8	50	†	—	„ „ 7½ „ 19 „
5	7. 6.	310	4	„ 1,25	20	†	—	„ „ 6½ „ 20½ „
6	7. 6.	310	4	„ 1,25	50	†	—	„ nach 92 Minuten
7	8. 6.	280	4	„ 1,12	50	—	†	„ „ 2½ bis 3 Tagen
8	7. 6.	300	3	„ 0,9	20	—	†	„ am 7. Tag
9	18. 6.	280	3	„ 0,84	50	—	†	„ nach 6½ bis 7 Tagen
10	18. 6.	280	3	„ 0,84	50	—	†	„ „ 3½ „ 4 „
11	4. 6.	390	2	„ 0,8	20	—	†	„ am 12. Tag
12	8. 6.	280	2	„ 0,56	50	—	†	„ „ 8. „
13	21. 6.	290	1,75	„ 0,51	20	—	†	„ „ 16. „
(14	21. 6.	300	1,75	„ 0,53	50	—	?)	„ „ 21. „ (Lungenvereiterung)
15	1. 8.	200	1,75	„ 0,35	50	—	—	Bleibt am Leben
16	21. 6.	260	1,5	„ 0,39	20	—	†	Tod nach 8 Tagen
17	18. 6.	200	1,5	„ 0,3	50	—	†	„ „ 3½ bis 4 Tage
18	1. 8.	230	1,25	„ 0,29	20	—	—	Bleibt am Leben
19	1. 8.	250	1,25	„ 0,31	50	—	—	„ „ „
20	1. 8.	220	1	„ 0,22	20	—	—	„ „ „
21	1. 8.	220	1	„ 0,22	50	—	—	„ „ „

Aus vorstehender Tabelle 1 ergibt sich, daß für Eosin vom Magen aus die sicher akut tödliche Dosis bei Meerschweinchen bei 5 g[1]), die sicher überhaupt tödliche Menge bei 2 g pro Kilogramm Körpergewicht liegt; Mengen von 1,75 und 1,5 g waren teils tödlich, teils wurden sie vertragen. 1,25 und 1,0 g hatten in keinem Falle irgend eine Wirkung.

Bei den Versuchen mit 4 g und mehr Eosin (Nr. 1 bis 7) färbten sich die Haut und die Schleimhäute der Tiere schon während des Lebens; beim Spektroskopieren des Ohrs mittels geeigneter Durchleuchtung[2]) ließ sich das charakteristische Eosinspektrum

[1]) Alle Zahlenangaben beziehen sich auf 1 kg Körpergewicht.

[2]) Vergl. E. Rost, Über den spektroskopischen Nachweis von Blutfarbstoffveränderungen im zirkulierenden Blut. Sitzung der Physiologischen Gesellschaft zu Berlin am 12. Februar 1909. Medizin. Klinik 1909 Nr. 7 u. 9.

(s. später) erkennen. Das Kammerwasser des Auges zeigte Grünfluoreszenz. Bei der Sektion waren alle Gewebe gefärbt; aus den Muskeln ließen sich durch Ausschütteln mit Wasser leicht Fluoreszenz und das Spektrum des Eosins zeigende Auszüge erhalten. Im Blut, in der Galle und im Harn der Harnblase war die für Eosin kennzeichnende Fluoreszenz sichtbar, ebenso wie sich spektroskopisch dieser Farbstoff nachweisen ließ. Das Vorderkammerwasser stellte nach dem Ausdrücken aus dem Augapfel eine schwachrötliche Flüssigkeit mit charakteristischem spektralem Verhalten dar.

Bei den Versuchen mit 3 g (Nr. 8 bis 10) trat nur zum Teil eine Verfärbung der Haut während des Lebens ein; auch bei der Sektion ließ sich nur in der Galle und im Harn Eosin nachweisen.

Bei den Versuchen mit niedrigeren Mengen als 3 g Eosin hing das Vorhandensein von Eosin in Galle und Harn von der Zeit ab, die seit der Eosineinführung bis zur Sektion verflossen war; so zeigte z. B. im Versuch Nr. 12 noch nach 8 Tagen der Harn eine deutliche Fluoreszenz und das Eosinspektrum. Selbst nach 1,5 g enthielten die Galle und der Harn noch nach Tagen Eosin.

Irgend welche charakteristischen Vergiftungserscheinungen konnten in keinem der Versuche beobachtet werden. Der Tod erfolgte unter dem so häufig bei pharmakologischen Untersuchungen anzutreffenden Bild der schlaffen Lähmung, die hier erst kurz vor dem Tode einsetzte. Die Tiere wurden kurze Zeit vor dem Tode matt, legten sich auf die Seite, machten Ruderbewegungen mit den Vorder- und Hinterbeinen und starben; die Atmung war zuletzt schnappend. Bei dem am 12. Tag verendeten Meerschweinchen Nr. 11, das zuletzt ebenfalls in schlaffer Lähmung dalag, schlug das Herz unregelmäßig und in ungleichmäßiger Stärke; bisweilen wurde der Kopf in den Nacken gedreht, bisweilen wurden Ruderbewegungen mit den Vorderbeinen ausgeführt. Diarrhöen traten bei keinem der Tiere ein.

Zum Vergleich wurden entsprechende Versuche mit Fluoreszein und Erythrosin angestellt, ebenfalls unter Verwendung von 20- und 50 % igen Lösungen, ausgenommen beim Erythrosin, das sich in Wasser zu 50 % nicht löst.

Aus der Tabelle 2 (Seite 179) ergibt sich, daß bei Meerschweinchen die Muttersubstanz des Eosins, das Fluoreszein, in Mengen von 6, 7 und 10 g pro Kilogramm Körpergewicht wohl nach 1 bis 2 Tagen tödlich wirkt, daß aber Mengen von 15 g erforderlich waren, um eine akute, innerhalb 2 Stunden ablaufende Wirkung zu erzielen. Nach einigen ausgeführten Versuchen (Tabelle 3, Seite 179) wirkt Erythrosin etwa in den gleichen Mengen wie das Eosin akut tödlich; selbst bei Zufuhr von außerordentlich großen Mengen Erythrosin (10 und 15 g), das nach Jodlbauers und Buscks Versuchen wirksamer ist als das Bromsubstitutionsprodukt, verging noch etwa $1^1/_4$ Stunde bis zum Eintritt des Todes. Dieses Ergebnis, wonach die Wirksamkeit in der Fluoreszeinreihe mit der Halogensubstitution zunimmt, deckt sich mit den Erfahrungen von Jodlbauer und Busck. Aus den später zu beschreibenden Versuchen geht hervor, daß bei geeigneter Versuchsanordnung unter einfachen Bedingungen durchweg die genannten Substitutionsprodukte stärker wirken als Fluoreszein, und daß unter diesen Unterschiede in der Wirkungsstärke bestehen, indem das Erythrosin das Eosin an Giftigkeit

Tabelle 2. Versuche zur Bestimmung der tödlichen Dosis des Fluoreszeins bei Meerschweinchen.

Einführung in den Magen. Verwendung 20 und 50 %iger Lösungen.

(Die Versuchstiere wurden etwa 24 Stunden vor Beginn des Versuchs ohne Nahrung gelassen.)

Laufende Nr.	Datum des Versuchs	Gewicht der Tiere in g	Menge Farbstoff: pro Kilogramm Körpergewicht berechnet g	Menge Farbstoff: tatsächlich eingeführte Menge, mit der Schlundsonde eingeführt g	Konzentration der eingeführten Lösung %	Die Tiere starben: innerhalb 24 Stdn.	Die Tiere starben: innerhalb von Tagen	Bemerkungen
22	19. 11.	270	15	rund 4,05	20	†	—	Tod nach 94 Minuten
23	19. 11.	250	15	„ 3,75	50	†	—	„ „ 112 „
24	19. 11.	280	10	„ 2,8	20	—	†	„ zwischen 25 u. 44 Stdn.
25	19. 11.	280	10	„ 2,8	50	—	†	„ „ 25 „ 44 „
26	19. 11.	350	7	„ 2,45	20	—	†	„ nach 2 bis 2½ Tgn.
27	19. 11.	310	7	„ 2,17	50	—	†	„ „ 25½ bis 44 Stdn.
28	19. 11.	290	6	„ 1,74	20	—	†	„ „ 2 bis 2½ Tgn.
29	19. 11.	290	6	„ 1,74	50	—	†	„ zwischen 26 u. 44 Stdn.

Tabelle 3. Versuche zur Bestimmung der tödlichen Dosis des Erythrosins bei Meerschweinchen.

Einführung in den Magen. Verwendung 20 %iger Lösungen.

(Die Versuchstiere wurden etwa 24 Stunden vor Beginn des Versuchs ohne Nahrung gelassen.)

30	19. 11.	250	15	rund 3,75	20	†	—	Tod nach 73 Minuten
31	19. 11.	240	10	„ 2,4	20	†	—	„ „ 74 „
32	19. 11.	230	6	„ 1,4	20	†	—	„ „ 103 „
33	19. 11.	220	5	„ 1,1	20	†	—	„ innerhalb 16 Stdn.

übertrifft. Aus den Versuchsprotokollen ist noch einiges hervorzuheben. Schon nach kurzer Zeit trat eine vollständige Verfärbung der Haut und der Schleimhäute der Tiere ein; besonders auffallend war der Anblick der 8 gleichzeitig in den Versuch genommenen Fluoreszein-Tiere, deren Pupillen infolge Fluoreszenz des Kammerwassers grün fluoreszierten und deren Augen bei Betrachtung aus der Ferne opakgrün aussahen. Das Vergiftungsbild war beim Fluoreszein ebenso uncharakteristisch wie nach der Einführung des Eosins; vorherrschend waren auch hier Zeichen der zentralen Lähmung. Beim Erythrosin ließ sich dagegen ziemlich deutlich ausgeprägt das bekannte Bild der zentralen Narkose mit Reflexverminderung, Einschlafen, leichter Erweckbarkeit, sowie erhaltenem Atemrhythmus und -tiefe beobachten. Bei der Sektion erwiesen sich in allen Fällen Blut und Galle farbstoffhaltig; die in zugeschmolzenen Reagenzgläsern aufbewahrten Proben behielten trotz 7 monatelangen Stehens am Laboratoriumsfenster ihre Färbung, ihre Fluoreszenzerscheinungen und ihr spektrales Verhalten bei.

Hinweise zur Erklärung der eigentümlichen Spätwirkung bei nicht akut tödlichen Mengen dieser Farbstoffe (tödliche Wirkung erst nach Tagen) haben sich nicht auffinden lassen.

Am Meerschweinchen wurde auch die Giftigkeit des Eosins bei Einspritzung in die Bauchhöhle untersucht; die Versuche brachten Material zur Frage nach der Aufsaugbarkeit des Eosins von der Peritonealfläche aus und nach dem Übertritt ins Blut und in die Galle.

Tabelle 4. Versuche zur Bestimmung der tödlichen Dosis des Eosins bei Meerschweinchen.

Einführung in die Bauchhöhle. Verwendung von 2,5-, 5- und 10 %igen Lösungen.

Laufende Nr.	Datum des Versuchs	Gewicht der Tiere in g	Menge Eosin: pro Kilogramm Körpergewicht berechnet g	Menge Eosin: tatsächlich eingespritzte Menge g	Konzentration der eingespritzten Lösung %	Die Tiere starben innerhalb 24 Stunden	Bemerkungen
34	22. 12.	200	1,5	rund 0,3	10	†	Tod innerhalb 2 Stunden
35	23. 12.	200	1,0	„ 0,2	10	†	„ „ 4 „
36	23. 12.	200	0,5	„ 0,1	10	†	„ „ 11 „
37	24. 12.	200	0,25	„ 0,05	5	†	„ „ 1 Tages
38	27. 12.	220	0,13	„ 0,025	2,5	—	Tier bleibt am Leben
39	25. 1.	350	1,4	„ 0,5	10	—	Tier wird nach 45 Min. getötet
40	25. 1.	350	1,4	„ 0,5	10	—	„ „ „ 60 „ „ (Keinerlei Vergiftungserscheinung)

Die Giftigkeit des Eosins war bei dieser Anwendungsweise bedeutend größer, indem bereits 5 cg (= 0,25 g pro 1 kg Körpergewicht) tödlich wirkten. Bisweilen wurde in diesen Versuchen ein rasch vorübergehendes Zittern der Tiere beobachtet, das eine gewisse Ähnlichkeit mit den durch Phenole und Kresole bewirkten eigentümlichen Zuckungen hatte; doch war der Befund nicht typisch und nicht konstant genug, um auf ihn einen besonderen Wert legen zu können. Die Tiere, die der Wirkung des eingespritzten Eosins erlagen, wurden entweder in schlaffer Lähmung in Seitenlage oder auf dem Bauche liegend mit seitlich abgestreckten Vorderbeinen, in den Nacken geschlagenem Kopf und aufgestellten Ohren tot vorgefunden. Bei dem Tier Nr. 34, das die größte Menge Eosin in die Bauchhöhle gespritzt erhalten hatte, waren die Innenseite der Haut, das Unterhautzellgewebe und die Augenbindehäute rot gefärbt. Das dem Augapfel entnommene Kammerwasser fluoreszierte, und selbst die Regenbogenhaut erschien leicht rosa, die Linse ungefärbt. Das Blut des Herzens war eosinrot gefärbt und hinterließ auf Händen, Instrumenten und Papier eosinrote Flecken, gab beim Schütteln im Glas einen roten Schaum und färbte die Glaswand rot. Die Muskulatur war nicht gefärbt. Das Blut der Tiere Nr. 35 bis 37 enthielt kein Eosin. Bei den Versuchen Nr. 39 und 40 wurde nach 45 bezw. 60 Minuten Blut durch Halsschnitt gewonnen. In beiden Fällen zeigte das Blut besonders in äußersten

Verdünnungen im Sonnenlicht (Konzentrierung des Lichts mittels einer Lupe) eine prachtvolle Fluoreszenz (Fluoreszenzkegel); das eosinrote Serum wies die gleiche Fluoreszenz und den für Eosin charakteristischen Absorptionsstreifen im Spektrum auf. Mit dem rot gefärbten Inhalt der Gallenblase beider Tiere konnte wie mit roter Tinte dauerhaft geschrieben werden.

Einige an Meerschweinchen ausgeführte Einspritzungen von Fluoreszein in die Bauchhöhle (Tabelle 5) zeigen, um wieviel weniger wirksam diese Substanz auch von der Peritonealfläche aus ist als ihr Bromderivat, das Eosin.

Tabelle 5. Versuche zur Bestimmung der tödlichen Dosis des Fluoreszeins bei Meerschweinchen.

Einführung in die Bauchhöhle. Verwendung von 5—20 %igen Lösungen.

Laufende Nr.	Datum des Versuchs	Gewicht der Tiere in g	Menge Fluoreszein pro Kilogramm Körpergewicht berechnet g	Menge Fluoreszein tatsächlich eingespritzte Menge g	Konzentration der eingespritzten Lösung %	Die Tiere starben innerhalb 24 Stunden	Bemerkungen
41	29. 5.	302	5,0	1,5	5	†	Tod nach 79 Minuten
42	29. 5.	295	5,0	1,5	10	†	„ „ 74 „
43	29. 5.	277	3,0	0,83	5	†	„ innerhalb 6 u. 19 Stdn.
44	29. 5.	278	3,0	0,83	10	—	„ im Laufe des 5. Tages
45	29. 5.	220	2,0	0,5	5	—	„ „ „ „ 6. „
46	29. 5.	252	1,0	0,22	5	—	„ „ „ „ 8. „
47	27. 5.	150	6,7	1,0	10	†	„ nach 49 Minuten
48	27. 5.	450	11,0	5,0	20	†	„ „ 53 „
49	27. 5.	415	12,0	5,0	10	†	„ „ 41 „

(5-8 Tage lang beobachtet)

Selbst bei Einspritzung außerordentlich großer Dosen wie in den Versuchen Nr. 47 bis 49 trat keine wesentliche Beschleunigung des Ablaufs der Vergiftung ein.

Bei sämtlichen Tieren (ausgenommen Nr. 46) war das Augeninnere opakgrün gefärbt. Die Tiere starben unter dem Bild zentraler Lähmung. Bei der Eröffnung der Augäpfel der innerhalb 24 Stunden verendeten Tiere erwiesen sich Kammerwasser und Glaskörper als grün gefärbt; die Linse war ungefärbt.

2. Versuche an Kaninchen.

Mit den im Nachfolgenden beschriebenen Versuchen an Kaninchen wurde der Zweck verfolgt, durch Verwendung so großer Mengen Eosin, wie sie bisher nicht angewendet worden sind, eine Vergiftung gewissermaßen zu erzwingen und sie der Beobachtung und pharmakologischen Zergliederung zugänglich zu machen. Kaninchen erschienen für solche Versuche besonders geeignet, da diese Tiere nicht erbrechen können und nach früheren Versuchen im Gesundheitsamte verhältnismäßig große Mengen Flüssigkeit bei der Eingießung in den Magen vertragen; etwaige örtliche Reizwirkungen

treten allerdings an der dünnen, zerreißlichen Magenschleimhaut der Kaninchen besonders leicht in die Erscheinung. Daß Eosin in Substanz, wenn etwas größere Mengen als die von A. Vogt verwendeten in den Bindehautsack eingebracht werden, leichte Schleimhautreizungen hervorrufen kann, davon kann man sich leicht durch den Versuch am Kaninchenauge überzeugen. Jodlbauer hatte bei Kaninchen Mengen bis zu 0,2 g Eosin pro Kilogramm Tiergewicht in den Magen eingeführt und ungiftig gefunden; Richter konnte bei Eingabe von 0,1 bis 1 g Eosin in den Magen von Kaninchen weder Giftwirkungen noch überhaupt einen Übertritt des Farbstoffes in den Harn konstatieren.

Unter Benutzung dieser Erfahrungen wurden Mengen von 1 bis 5,5 g pro Kilogramm Körpergewicht einmal und wiederholt in körperwarmer Flüssigkeit mit der Schlundsonde verabreicht. Besondere Aufmerksamkeit wurde bei diesen Versuchen der Feststellung der Körpertemperatur, gemessen 10 cm tief im Mastdarm, zugewendet, desgleichen bei der Sektion der spektroskopischen Untersuchung des Bluts.

Tabelle 6. Versuche an Kaninchen mit Einführung von Eosin in den Magen.

(Die Versuchstiere wurden etwa 24 Stunden vor Beginn des Versuchs ohne Nahrung gelassen.)

Laufende Nr.	Datum des Versuchs	Gewicht der Tiere in g	Menge Eosin		Die Tiere starben		Bemerkungen
			pro Kilogramm Körpergewicht berechnet g	tatsächliche mit der Schlundsonde eingeführte Menge g	innerhalb 24 Stunden	innerhalb von Tagen	
50	28. 12.	♂ 2650	1	2,65 in 100 ccm Wasser	—	†	Harn am 10. Tag noch rötlich und fluoreszierend. Tod am 12. Tag. Gewichtsverlust 800 g. Bei der Sektion alle Gewebe gefärbt, Kammerwasser fluoreszierend.
51	28. 12.	♂ 2750	2	5,5 in 150 ccm Wasser	—	†	Gewichtsverlust am 10. Tag: 700 g. Tod am 15. Tag in schlaffer Lähmung. Temperatur 30 Min. vor dem Tod 33,6°. Gewebe nicht gefärbt. Harn fluoresziert, Galle eosinhaltig.
52	29. 12.	♀ 2500	3 [1])	7,5 in 150 ccm Wasser	—	—	1. Tag Diarrhöe. Rotfärbung der Haut, der Schleimhäute, Fluoreszenz des Kammerwassers, vorübergehend. Gewichtsverlust am 9. Tag: 150 g, Harn am 9. Tag noch rotgelb und fluoreszierend. Harn am 26. Tag eosinfrei. Galle bei der am 83. Tag erfolgten Sektion eosinfrei.
53	4. 1.	♂ 2500	4	10 in 150 ccm Wasser	†	—	Nach 3 Stunden Rotfärbung der Haut, der Schleimhäute, Fluoreszenz des Kammerwassers. Tod zwischen 14 und 22 Stunden. Bei der Sektion alle Gewebe gefärbt. Magen ohne Entzündungserscheinungen. Galle stark eosinhaltig, Blut eosinhaltig.

[1]) Ein Kaninchen von 2500 g Körpergewicht, dem 7,5 g Eosin in 100 ccm Wasser in den Magen gebracht wurden, zeigte bei der Sektion (Tötung 18 Stunden nach der Eingabe): Fluoreszenz des Kammerwassers, leichte Rosafärbung der Haut, Fluoreszenz und Spektralstreifen des Eosins im Blut, Eosinspektrum bei direkter Betrachtung der eröffneten Bauchhöhle mit dem Spektroskop. Die Nieren wiesen keine Gewebsveränderungen auf.

Laufende Nr.	Datum des Versuchs	Gewicht der Tiere in g	Menge Eosin: pro Kilogramm Körpergewicht berechnet g	Menge Eosin: tatsächliche mit der Schlundsonde eingeführte Menge g	Die Tiere starben: innerhalb 24 Stunden	Die Tiere starben: innerhalb von Tagen	Bemerkungen
54	6. 1.	♂ 3300	4	13,2 in 150 ccm Wasser			Intensive Rotfärbung der Haut, der Schleimhäute, Fluoreszenz des Kammerwassers. Harn nach 12 Stunden dunkelrot.
	7. 1. (etwa 21 Stunden später)	—	4	13,2 in 150 ccm Wasser	†	—	21 Stunden nach der ersten Gabe, als die Färbung schon stark abgeblaßt ist, erneute Gabe. 38 Minuten später Tod wie bei Erstickung. Bei der Sektion alle Gewebe gefärbt. Magen außerordentlich stark ausgedehnt; keine Schwellung, keine Substanzverluste. Galle und Harn stark eosinhaltig, Blut eosinhaltig.
				26,4			
55	2. 3.	♂ 3700	5	18,6 in 185 ccm Wasser	†	—	Intensive Rotfärbung der Haut, der Schleimhäute, Fluoreszenz des Kammerwassers. Nach 80 Minuten matt. Tod innerhalb 3 bis 4 Stunden, Bei der Sektion alle Gewebe gefärbt. Galle (1,3 g) enthielt 0,0141 g Eosin.
56	4. 1.	♂ 1850	2	3,7 in 100 ccm Wasser	getötet	—	Nach 9 Stunden Diarrhöe. 25 Stunden nach der Eingabe getötet. Bei der Sektion Gewebe nicht gefärbt. Dünndarm gelblichrötlich durchschimmernd und auf der Schleimhaut gelb.
57	2. 3.	♂ 900 (krank)	5,5	5 in 100 ccm Wasser	†	—	Intensive Rotfärbung des Tieres. Tod nach mehreren Stunden während der Nacht. Bei der Sektion alle Gewebe gefärbt. Leber einschließlich Galle enthielt 0,0055 g Eosin.
58	4. 1.	♂ 1800	2	3,6 in 100 ccm Wasser			Nach 8 Stunden Diarrhöe. 24 Stunden nach der 2. Eingabe getötet. Bei der Sektion Gewebe nicht gefärbt. Magen ungefärbt, Darm gefärbt. Galle und Harn eosinhaltig.
	5. 1. (24 Stunden später)	—	2	3,6 in 100 ccm Wasser	getötet		
				7,2			
59	5. 1.	♀ 2250 (gravid)	2	4,5 in 100 ccm Wasser			Am 2. und 3. Tag Diarrhöe. Stirbt 21 bis 23 Stunden nach der dritten Dosis. Bei der Sektion alle Gewebe gefärbt. Galle leuchtend rot, Harn eosinhaltig. Veränderungen des Magens und Dickdarms.
	6. 1.		2	4,2 in 100 ccm Wasser			
	7. 1.	—	2	4,0 in 100 ccm Wasser	†	—	
				12,7			

Irgendwelche charakteristischen Vergiftungserscheinungen traten auch bei Kaninchen nicht auf; die Tiere starben unter dem bei den Versuchen an Meerschweinchen beobachteten Bild. Mehr oder weniger starker Gewichtsverlust infolge verminderter Nahrungsaufnahme und vereinzelt auftretende leichte Diarrhöen waren die einzigen objektiven Folgen der Eosineingießung. Nach einmaliger Gabe vergingen zum mindesten mehrere Stunden bis zum Tod des Versuchstiers; nur im Versuch Nr. 54 starb das Tier bereits 38 Minuten nach der zweiten Einführung von 13,2 g Eosin in 150 ccm Wasser, aber trotz der außerordentlich großen Menge auch nicht unter dem Bild einer Vergiftung, sondern wie bei einer Erstickung; der Umstand, daß der Magen

des Tiers, das nicht mehr gefressen hatte, bei der Sektion sich als sehr stark aufgebläht erwies, spricht hierfür. Eine Ursache für den Spättod der Tiere Nr. 50 und 51, die nur 1 bezw. 2 g Eosin pro Kilogramm Körpergewicht erhalten hatten, hat sich nicht finden lassen. Die Innentemperaturen, gemessen im Rektum, zeigten keine Abweichungen von der Norm; die im Versuch Nr. 51 festgestellte Temperaturerniedrigung bis auf 33,6° unmittelbar vor dem Tod ist nichts für den einverleibten Farbstoff Charakteristisches, da in schlaffer Lähmung daliegende, die Temperatur nicht mehr regulierende Kaninchen hochgradige Abkühlung zeigen.

Auch bei den Versuchen an Kaninchen stellte sich Rosafärbung der Haut, besonders beim Anblasen des Fells bemerkbar, und Rosafärbung der Schleimhäute (des Auges, der Nase, des Mauls und der Geschlechtsorgane), sowie Grünfluoreszens des Augenkammerwassers ein. Konstant konnten diese Verfärbungen aber erst bei Zufuhr von 3 g und mehr Eosin beobachtet werden. In der Regel setzte die Rosafärbung im Verlauf der ersten Stunde ein und erreichte innerhalb 2 bis 4 Stunden den Höhepunkt; sofern der Tod nicht den Versuch abbrach, ging diese Färbung vorüber. In allen Fällen war der Harn mehrere (15 und mehr) Tage lang eosinhaltig; kam das Tier innerhalb einer begrenzten Zeit zur Sektion, so enthielt auch die Galle Eosin. Blutveränderungen konnten im Kadaver nie gefunden werden. Das Kaninchen des Versuchs Nr. 59, das im ganzen 12,7 g Eosin erhalten hatte, zeigte im Fundusteil des Magens mehrere punkt-, strich- und herdförmige, verfärbte, wie eingezogen erscheinende Stellen, über die aber die Schleimhaut spiegelnd hinweglief, im Dünndarm stark geschwollene Plaques und stecknadelkopfgroße Erhöhungen, im Dickdarm stellenweise Erhöhungen mit kraterförmiger Einziehung. Ob diese Befunde durchweg auf das in den genannten großen Mengen eingeführte Eosin zurückzuführen sind, läßt sich ohne Vornahme zahlreicher analoger Versuche nicht entscheiden, für die aber keine Veranlassung gegeben war, da Versuche mit solchen Mengen Eosin nicht einmal toxikologisches Interesse besitzen.

Über die bei den Versuchen Nr. 55 und 56 in einzelnen Organen und Körperflüssigkeiten nachgewiesene Menge Eosin soll später berichtet werden.

Um die Wirkungen des Eosins mit denen des auch bei Menschen zu diagnostischen Zwecken ärztlich angewendeten Fluoreszeins und des Erythrosins vergleichen zu können, sind auch mit diesen Farbstoffen einige orientierende Versuche angestellt wurden, die deswegen hier angeführt werden, weil sie geeignet sind, den raschen Übertritt dieser drei in Lösungen von gewisser Konzentration rosarot, zitronengelb und violettrot gefärbten Farbstoffe in die Blutbahn und in das Kammerwasser des Auges, die verschiedene, aber einen typischen Farbenton zeigende, vorübergehende Färbung der Haut (beim Anblasen des Fells) und der sichtbaren Schleimhäute, den Übergang des Farbstoffs in den Harn und schließlich das Verschwinden der Färbungen zu zeigen. Allein an der Färbung und Fluoreszenz des Kammerwassers, noch mehr an der Verfärbung der Haut und Schleimhäute kann erkannt werden, welcher der drei Farbstoffe in den Magen eingeführt worden ist. Führt man nach einigen (2 bis höchstens 3) Wochen die Tötung der Tiere aus, so kann noch das Vorhandensein des Farbstoffs in der Galle der Gallenblase dargetan werden zu einer Zeit, wo der Harn

bereits ungefärbt erscheint und auch sonst nachweisbaren Farbstoff nicht enthält. Die geeigneten Mengen sind für Eosin 3 g, für Erythrosin 2,5 g und für Fluoreszein 2,0 g pro Kilogramm Körpergewicht in 150 ccm Wasser.

Tabelle 7. Versuche an Kaninchen mit Einführung von Fluoreszein und Erythrosin in den Magen.

(Die Versuchstiere wurden etwa 24 Stunden vor Beginn des Versuchs ohne Nahrung gelassen.)

Laufende Nr.	Datum des Versuchs	Gewicht der Tiere in g	Menge Farbstoff: pro Kilogramm Körpergewicht berechnet g	Menge Farbstoff: tatsächlich, mit der Schlundsonde eingeführte Menge g	Die Tiere starben: innerhalb 24 Stunden	Die Tiere starben: innerhalb von Tagen	Bemerkungen
			a) Fluoreszein:				
60	5. 1.	♀ 2100 (gravid)	2	4,2 in 100 ccm Wasser	—	—	Zitronengelbe, ins Grünliche schimmernde Verfärbung der Haut und Schleimhäute, Fluoreszenz des Kammerwassers. Nach 7 Stunden blassen die Verfärbungen ab. Innerhalb 3 Tagen kein Gewichtsverlust. Harn leuchtend gelbgrünfluoreszierend. Am 7. Tag bei direkter Betrachtung fluoreszierender Harn. Am 10. Tag noch spektroskopisch und im Sonnenlichtkegel Fluoreszein erkennbar. Am 17. Tag spektroskopischer Nachweis im Harn unsicher; am 19. Tag Harn fluoreszeinfrei.
61	5. 1.	♀ 2250	3	6,75 in 150 ccm Wasser	—	—	Verfärbung wie bei Nr. 60, nur länger anhaltend. Innerhalb 3 Tagen 200 g Gewichtsverlust. Harn am 10. Tag noch intensiv (stärker als Nr. 60) gelbgrünfluoreszierend; Fluoreszenz am 17. Tag im Sonnenlichtkegel erkennbar. Bei der am 20. Tag erfolgten Tötung enthält die dunkelgrasgrüne Blasengalle noch Fluoreszein.
			b) Erythrosin:				
62	5. 1.	♂ 2500	3	7,5 in 150 ccm Wasser	—	†	Carmoisinrote, von der Eosinfärbung scharf zu scheidende Färbung der Haut und der Schleimhäute, Kammerwasser rot leuchtend. Verfärbung nach 9 Stunden stark abgeblaßt, nach 20 Stunden vollständig vergangen. Harn violettrosa. Innerhalb 2 Tagen 300 g Gewichtsverlust. Am 11. Tag tot aufgefunden. Bei der Sektion alle Gewebe violettrötlich gefärbt. Die bläulichrötliche Galle der Gallenblase fluoresziert charakteristisch; spektroskopisch Erythrosin nachweisbar.

Bei weiteren Versuchen, bei denen 2 bis 3 g der Farbstoffe pro Kilogramm Körpergewicht (Kaninchen von 2050 g: 4 g Fluoreszein in 100 ccm Wasser; Kaninchen von 2950 g: 9 g Erythrosin in 100 ccm Wasser) in den Magen eingeführt wurden, traten die beschriebenen Verfärbungen ebenfalls schon nach 10 bis 20 Minuten ein. Das Erythrosintier entleerte diarrhöischen Kot und starb schon nach einigen Stunden. Das nach 18 Stunden getötete Fluoreszeintier wies noch eine leicht zitronengelbe Färbung der Haut und der Schleimhäute auf. Der Dickdarm schimmerte dunkelgrün durch. Mit dem Spektroskop konnte man ebenso wie beim Erythrosintier bei direkter Be-

trachtung der eröffneten Bauchhöhle die charakteristischen Absorptionsbänder im Spektrum erkennen. Die Nieren waren frei von Veränderungen.

Wenn diese Versuche auch gering an Zahl sind, so zeigen sie doch, daß auch beim Kaninchen die Muttersubstanz des Eosins, das Fluoreszein, und sein Jodsubstitutionsprodukt, das Erythrosin, nach Aufsaugbarkeit, Verbleiben im Körper und Ausscheidung sich ebenso verhalten wie das Bromsubstitutionsprodukt des Fluoreszeins. Die geringere Giftigkeit des Fluoreszeins gegenüber seinem Jodsubstitutionsprodukt ist unverkennbar. Temperatur und Blutbeschaffenheit waren nach Zufuhr beider Farbstoffe unverändert.

Zu den Versuchen an Kaninchen mit Einspritzung unter die Haut wurden Mengen von 0,25 bis 1,3 g pro 1 kg Körpergewicht, durchweg in 10%iger Lösung verwendet. Die Einspritzung wurde in der Regel an zwei Stellen der Rückenhaut vorgenommen, sie verursachte den Tieren Schmerzen (s. Tabelle 8, S. 187).

Bei allen Tieren stellten sich mehr oder weniger umfangreiche Abszesse an den Stellen der Einspritzungen ein und führten zur Beschränkung der Gebrauchsfähigkeit der hinteren Gliedmaßen, die auch Le Goff und Sainton an Hunden nach subkutaner Einspritzung beobachtet haben. Dieses Nachschleppen der Beine hat aber nichts mit einer Lähmung zu tun, wie die genannten Autoren vermuten.

Bei den Kaninchen ließ sich die Fluoreszenz des vorderen Augenkammerwassers mit der Lupenbeleuchtung (Sonnenlichtkegel) gut beobachten; es gelang auch ohne Mühe zu zeigen, daß die Färbung im Auge die Linse nicht betrifft.

Auch diese Versuche an Kaninchen mit subkutaner Einspritzung führten nicht zu einer Vergiftung, deren Erscheinungen sich hätten pharmakologisch fassen lassen.

Intravenöse Einspritzungen an Kaninchen vorzunehmen, erschien überflüssig, nachdem Richter und später insbesondere Jodlbauer und Busck auch bei dieser Applikationsweise nennenswerte Wirkungen auf den Ablauf der Funktionen einzelner Organe nicht hatten nachweisen können. Es war nach den von diesen Autoren beschriebenen Erfahrungen nicht zu erwarten, bei der gedachten Anwendungsart eine besondere Giftwirkung des Eosins in die Erscheinung treten zu sehen.

3. Versuche an Hunden.

Zu diesen Versuchen wurden Tiere verschiedenen Alters und Geschlechts verwendet; sämtliche Tiere waren gesund, größtenteils im Versuchsstall aufgezogen und durchweg in ihrer Futteraufnahme und ihrem sonstigen Verhalten genau bekannt. Das Eosin wurde, in Wasser oder in Milch gelöst, in den Magen der Versuchstiere einlaufen gelassen, um die Menge des dem Tiere einverleibten Stoffs, die Konzentration der Lösung, in der es verabreicht wurde, und die Zeit, in welcher das Eosin in den Magen gelangte, genau angeben zu können; nur vereinzelt ist der Farbstoff in die Substanz eingeführt worden. Die Dauer der Versuche wurde mannigfach gestaltet. Die längste Versuchszeit erstreckte sich auf 135 Tage, an denen Hunden im Gewicht von 8 kg täglich Mengen bis zu 2 g, im ganzen 246 bis 268 g Eosin verabreicht wurden. In einem Fall wurden einem Hund von 9 kg Körpergewicht täglich Mengen bis zu 10 g (d. h. über 1 g, auf 1 kg Körpergewicht berechnet) während 21 Tage, im ganzen 139,5 g, Eosin in wässeriger Lösung eingegossen.

Tabelle 8. Versuche an Kaninchen mit Einführung von Eosin unter die Haut.
(10%ige Lösung.)

Laufende Nr.	Datum des Versuchs	Gewicht der Tiere in g	Menge Eosin: pro Kilogramm Körpergewicht berechnet g	Menge Eosin: tatsächlich eingespritzte Menge g	Die Tiere starben: innerhalb 24 Stunden	Die Tiere starben: innerhalb von Tagen	Bemerkungen
63	28. 12.	♀ 2100	rund 0,25	0,5	—	—	Einstichstellen gerötet, Kammerwasser fluoresziert nicht. Am 2. Tag Diarrhöe. Hinterkörper wird infolge Verwachsungen durch Abszesse an den Einstichstellen geschont. Die Gewichtsabnahme von 250 g innerhalb 7 Tagen gleicht sich wieder aus. Am 17. Tag fluoresziert der Harn nicht mehr, am 28. Tag ist die Galle eosinfrei.
64	28. 12.	♂ 2150	rund 0,5	1,0	—	—	Einstichstellen gerötet, Kammerwasser fluoresziert nicht. Abszedierung wie bei Nr. 63 (Schonung des Hinterkörpers infolge von Verwachsungen). Gewichtsverlust innerhalb 10 Tagen 350 g. Tier wird am 20. Tag getötet. Harn und Galle eosinfrei.
65	30. 12.	♀ 2250	rund 1,0	2,0	—	—	Rotfärbung der Haut, der Schleimhäute. Fluoreszenz des Kammerwassers. Nach 2 Tagen ist die Färbung verschwunden. Abszesse an den Einstichstellen. Gewichtsverlust innerhalb 6 Tagen 250 g. Harn typisch rotgelb, grünfluoreszierend. Am 19. Tag Tier getötet. Gewebe außer an den Einstichstellen nicht gefärbt. Harn eosinfrei. Galle enthält Eosin, das sich an der Fluoreszenz und an dem spektroskopischen Verhalten erkennen läßt.
66	3. 1.	♂ 2250	rund 1,0	2,0	—	†	Rotfärbung der Haut, der Schleimhäute. Fluoreszenz des Kammerwassers. Nach 1 Tag ist die Färbung fast vollständig verschwunden. Ausgedehnte Abszesse an den Einstichstellen. Gewichtsverlust 400 g. Tier stirbt nach $4^1/_2$ Tag. Gewebe außer an den Einstichstellen nicht verfärbt. Galle eosinhaltig. Harn aus der Blase rotgelb, grün fluoreszierend. Von der blaßgrauen Magenschleimhaut setzt sich scharf abgeschnitten der gelbrot durchgefärbte Dünndarm ab.
67	29. 12.	♂ 2250	1,3	3,0	—	† (?)	Nach 5 Stunden Ohreninnenfläche rosarot gefärbt, nach 8 Stunden Haut und Schleimhäute rot, Kammerwasser stark fluoreszierend. Stirbt nach 25 bis 26 Stunden auf dem Transport (Erstickung durch ungenügende Luftzufuhr?). Bei der Sektion alle Gewebe gefärbt.
68	3. 1.	♂ 2400	1,25	3,0	—	—	Rotfärbung der Haut, der Schleimhäute, Fluoreszenz des Kammerwassers. Nach 1 Tag ist die Rosafärbung noch völlig erhalten. Harn rotgelb, grünfluoreszierend. Abszesse an den Einstichstellen. Am 14. Tag getötet. Bei der Sektion des Unterhautzellgewebes in der Umgebung der Einstichstelle gerötete Gewebe, sonst nicht gefärbt. Galle eosinhaltig. Harn frei von Eosin.

Auch erhielt eine tragende Hündin, die schon vor der Konzeption wochenlang mit Eosin behandelt worden war, vom ersten bis zum letzten Tag der 63 Tage währenden Tragezeit Eosineingießungen; desgleichen wurden säugende Hunde zum Versuch mit Eosin verwendet. Alle Hunde wurden — soweit irgend angängig — dem Sonnenlicht im Freien ausgesetzt.

Geprüft wurden das Befinden, die Freßlust, das Körpergewicht, die Körpertemperatur der Tiere, das Verhalten des Harns hinsichtlich etwaigen Eiweiß- und Zuckergehalts, der Übergang von Eosin in die Milch der säugenden Tiere und die Neugeborenen oder die mehrere Tage lang an dem Muttertiere belassenen jungen Hunde (s. Tabelle 9, S. 189).

Abgesehen von ganz vereinzelt auftretendem Erbrechen, bisweilen sich einstellender, stets aber rasch vorübergehender Entleerung von dünnem oder diarrhöischem Kot konnte keinerlei Störung in dem Befinden der Hunde beobachtet werden. Die Nahrungsaufnahme blieb trotz der täglichen Eingießung von Eosinlösung in den Magen unverändert, das Körpergewicht nahm im Laufe selbst langdauernder Verfütterung nicht oder nicht wesentlich ab. Harnveränderungen konnten nicht festgestellt werden; nur bei dem Versuch Nr. 75, in dem einem Hund 30 g bei abgebundener Speiseröhre verabreicht wurden, enthielten die gegen Ende des Versuchs mit dem Katheter erhaltenen Harnproben Eiweiß. Die Körpertemperatur war in allen Fällen unverändert. Bei der Tötung und Sektion der Tiere kurz oder erst mehrere Tage nach der letzten Eosindarreichung zeigte sich weder eine Verfärbung der Organe und Gewebe (Muskeln, Unterhautzellgewebe, Fett) noch eine nachweisbare Veränderung in der Gewebsstruktur der Organe.

Ausgenommen ist auch hier der eben erwähnte Hund, der zum Versuch Nr. 75 diente (s. unten).

Das Blut wies stets den normalen spektralen Befund auf.

An dem unter Anwendung von Betäubungsmitteln operierten und während der Beobachtungszeit dauernd durch Morphin und Skopolamin im Halbschlaf gehaltenen Hund Nr. 75 von 12 kg Körpergewicht, dessen Speiseröhre zur Verhinderung von Erbrechen abgebunden wurde, konnte festgestellt werden, daß selbst Mengen von 2,5 g, auf das Kilogramm Körpergewicht berechnet (30 g Eosin in 300 ccm Wasser auf einmal in den Magen eingeführt), ohne jede Giftwirkung auf das Tier blieben. Das Tier zeigte nach 7 Stunden nur reichliche diarrhöische Darmentleerung; nach 9 Stunden wurde es durch tiefes Chloroformieren getötet.

Im besonderen ist noch zu bemerken, daß die Hündin im Versuch Nr. 70, die am 5. 3. von einem gleichfalls mit Eosin behandelten Hund (Nr. 72) belegt wurde und bis zum 6. Mai täglich 2 g Eosin in Lösung in den Magen eingegossen erhielt, in der Nacht vom 6. zum 7. Mai drei normal entwickelte Junge warf. Zwei dieser Tiere (240 und 200 g schwer) wurden wenige Stunden nach der Geburt von dem Muttertier genommen, an dem sie bereits gesaugt hatten, und durch Chloroformieren getötet: Der im Magen vorhandene Inhalt (Milch) war frei von Eosin, desgleichen der Harn und die Galle. Die Gewebe zeigten in der Färbung keine Abweichung von dem normalen Zustand. In der Galle des 10 Tage lang gesäugten dritten Hündchens war kein Eosin zu finden. Es war also weder auf dem Wege der Uteringefäße noch auf dem der Milch Eosin vom Muttertier auf die jungen Hunde übergegangen.

Auch in einem zweiten Versuch (Nr. 71), bei dem täglich 0,5 g Eosin in den Magen gegossen wurden, ließ sich Eosin in der Milch nicht nachweisen. Die Hündin Nr. 71 hatte am Vormittag des 22. 12. ein Junges geworfen; nach dem Entleeren von

Tabelle 9. Versuche an Hunden mit Einführung von Eosin in den Magen.

Laufende Nr.	Nr. des Labor.-Journals	Gewicht der Tiere in g	Dauer des Versuchs		Menge Eosin				Veränderungen des Körpergewichts g	Bemerkungen
			eintägig	mehrtägig	pro Kilogramm Körpergewicht berechnet g	tatsächlich mit der Schlundsonde eingeführte Menge g	während ? Tage	Eosin insgesamt g		
69	162	♂ 8000	—	22. 12. bis 13. 1.	rund 0,06	0,5 in 50 ccm Wasser	23	11,5	am 13. 1.: 7600	—
70	168	♀ 7950	—	22. 12. bis 6. 5.	bis zu rund 0,24	steigend bis 2,0 101mal 2,0 in 100 ccm Wasser	135	246	am 5. 3.: 8000 am 3. 5.: 9500	Wird am 5. 3. vom Hund 161 belegt. Wirft in der Nacht vom 6./7. 5. drei Junge.
71	80	♀ 9400 (vor dem Werfen)	—	22. 12. bis 13. 1.	rund 0,06	0,5 in 50 ccm Milch	23	11,5	—	Hat am 21. 12 ein Junges geworfen, das am 1. 1. das Gewicht von 430 g erreicht.
72	161	♂ 8000	—	23. 12. bis 6. 5.	rund 0,25	128mal 2,0 (vereinz. 3,0) in 100 ccm Wasser	134	268	am 6. 5.: 8300	—
73	160	♂ 9450	—	24. 12. bis 13. 1.	bis zu rund 1,0	10mal 5,0 1mal 5,5 1mal 6,0 1mal 6,5 1mal 7,0 1mal 7,5 1mal 8,0 1mal 9,0 4mal 10,0	21	139,5	am 13. 1.: 8800	—
74	167	♀ 9250	—	27. 12., 29. bis 30. 12.	—	1mal 5,0 1mal 7,0 1mal 1,0	3	—	—	Tier erbricht nach jeder Eingießung. Tier läufig. Versuch abgebrochen.
75	—	♀ 12 000	30. 12.	—	2,5	30,0 in 300 ccm Wasser	—	30	—	Nach Einführung d. Eosins Speiseröh. in Nark. abgebunden. Nach 7 Std. starke Diarrhöe, nach 9 Std. getötet. Bei der Sektion alle Gewebe gefärbt. Nieren normal.
76	165	♂ 8700	6. 1.	—	rund 0,34	3,0 in 100 ccm Wasser	—	3,0	—	—
77	166	♂ 9300	—	6. 1. bis 8. 1.	rund 0,32	3,0 in 100 ccm Wasser	3	9,0	—	—
78	—	♂ 8700	8. 1.	—	—	1,0 in 50 ccm Wasser	—	—	—	Das Tier ist nüchtern; kein Erbrechen.
79	—	♀ 40 000	9. 6.	—	—	10,0 (in Fleisch)	—	—	—	—
80	166	♂ 10 400	9. 6.	—	—	3,0	—	—	—	—

Milch aus den strotzend gefüllten Zitzen am Nachmittag erhielt sie 0,3 g Eosin und am 23. 12. 0,5 g Eosin in 50 ccm Milch mit der Schlundsonde, Mengen, die den daraufhin entleerten Kot intensiv rot färbten. Trotz täglich fortgesetzter Eosinzufuhr war die Milch eosinfrei. Das Junge wurde nach 18 tägiger Säugezeit getötet; Galle und Harn waren frei von Eosin. 12 Stunden nach der letzten Eosineingießung wurde das Muttertier getötet, der Harn wies äußerst geringe, nur im Lichtkegel erkennbare Fluoreszenz auf, der Inhalt der Gallenblase (5,6 ccm) war dagegen goldgelbgrün und fluoreszierte stark. Die Schleimhaut des Anfangsteils des Dünndarms war leicht ziegelrot angefärbt; im Dünndarm rötlichgelber Schleim.

Im übrigen sind über das Verbleiben des Eosins und über seine Ausscheidung aus dem Körper noch einige Bemerkungen zu machen, besonders da nach den Angaben Richters erst bei sehr großen Mengen Rotfärbung des Harns eingetreten und nach Primes klinischen Beobachtungen erst nach wiederholter Eingabe verhältnismäßig großer Mengen Eosin dieser Farbstoff in den Harn übergetreten sein soll.

Im Versuch Nr. 69 (Gewicht des Hundes 8000 g) zeigte sich erst nach der dritten Eingabe von 0,5 g Rotfärbung des Harns, während der Kot schon nach der ersten Gabe intensiv rot gefärbt war. Die Menge von 0,5 g war für diesen Hund derart, daß der Harn schon nach etwa 24 Stunden eosinfrei war. Als nach der 7. Gabe der Harn 50 Minuten, 15 und 24 Stunden nach dem Eingießen mit dem Katheter entnommen wurde, zeigte wohl die erste Probe deutliche Rotfärbung und Fluoreszenz, die zweite Probe ließ aber bereits nur sehr geringe Fluoreszenz erkennen, die dritte war so gut wie frei von Eosin. Nachdem die Eingießungen 23 Tage lang fortgesetzt waren, änderte sich der Gang der Ausscheidung nicht; der 24 Stunden nach Beendigung des Versuchs entleerte Harn ließ Fluoreszenz nur noch im Sonnenlichtkegel erkennen, nach 40 Stunden enthielt der Harn kein Eosin mehr. Bei der am 7. Tag nach der letzten Eingießung von Eosinlösung vorgenommenen Sektion wies der Inhalt der Gallenblase (8,2 ccm) dagegen noch Eosin auf.

Nicht anders war der Gang der Ausscheidung nach Gaben von 1,0 und 2,0 g. Der Hund Nr. 70 schied gegen Ende eines Versuchstages (18 bis 24 Stunden nach der letzten Eingabe von 1,0 g Eosin) einen nur sehr gering fluoreszierenden Harn aus, während der Kot intensiv gefärbt war. Hund Nr. 72, dem täglich 2,0 g Eosin eingegossen wurden, zeigte in dem gegen Ende eines Versuchstags entleerten Harn nur sehr geringe Fluoreszenz. Nach der 6. Einspritzung von 2 g Eosin wies der Harn nach 55 Minuten deutliche, nach 14 Stunden nur mehr schwache und nach 24 Stunden keine Fluoreszenz auf. Drei Tage nach Beendigung des Versuchs (134 Eingießungen von insgesamt 268 g Eosin) war der Harn frei von Eosin.

Wurden dem Hund Nr. 73 5 g Eosin eingegeben, so war der Harn orangegelb und fluoreszierte sehr stark. Schon 24 Stunden nach der letzten Eingießung von 5,0 g war die Fluoreszenz des Harns aber nur noch gering.

Bei diesen Versuchen war es also im wesentlichen belanglos, ob Mengen von 0,5 oder 5,0 g Eosin Hunden von dem angegebenen Körpergewicht verabreicht wurden: die in den Kreislauf übertretende und mit dem Harn zur Ausscheidung gelangende

Menge Eosin war annähernd gleichmäßig gering. Schon 36 Stunden nach Beendigung des Versuchs, in dem der Hund während 21 Tagen 139,5 g Eosin erhalten hatte, fluoreszierte der Harn nicht mehr. Die Galle hielt dagegen den eingeführten Farbstoff länger fest; der Inhalt der Gallenblase (10 ccm) wies bei der Tötung 12 Tage nach der letzten Farbstoffeingießung noch Eosin auf. Das Blutserum war frei von Eosin.

Um den Gang der Eosinausscheidung in den ersten Stunden nach der Einführung einer großen Menge Farbstoff festzustellen, wurde bei dem Hund Nr. 75 während der ersten Stunde nach der Zufuhr von 30 g Eosin alle 10 Minuten Harn mit dem Katheter entnommen. Die nach 10 Minuten entnommene Harnprobe zeigte noch keine Fluoreszenz; diese setzte erst nach 20 Minuten ein, wurde mit vorschreitender Zeit immer deutlicher und blieb längere Zeit etwa gleich stark. Nach etwa 2 Stunden begann sich Rotfärbung der Haut und der Schleimhäute des Tieres einzustellen, die auch bei der nach weiteren 7 Stunden ausgeführten Sektion erhalten war: Alle Gewebe des Tiers waren rosarot gefärbt, selbst Knochen und Knochenmark; eine sehr geringe Färbung wies das Fettgewebe, die allergeringste das Gehirn auf. Der Inhalt der Gallenblase glich in der Farbe einer Eosinlösung.

Die zahlreichen Proben eosinhaltiger Harne, die in Reagenzgläsern eingeschmolzen im zerstreuten Tageslicht aufbewahrt wurden, zeigten die bekannte Bleichung, einen Autoxydationsvorgang, den Heffter näher untersucht hat.

Es zeigte sich also bei diesen Versuchen an Hunden, daß nach der Eingabe von Eosin in den Magen verhältnismäßig große Mengen erforderlich sind, bis Eosin in den Harn übertritt, daß, im Gegensatz zur Einführung in die Blutbahn und unter die Haut (Jodlbauer und Busck), vom Magen aus auch bei Zufuhr größerer Mengen Eosin immer nur so geringe Mengen Eosin mit dem Harn zur Ausscheidung gelangen, daß die Ausfuhr durch die Nieren beim Hund im wesentlichen nach 1 bis höchstens 2 Tagen als beendet angesehen werden kann.

Die an einigen Hunden zum Vergleich angestellten Versuche mit Fluoreszein und Erythrosin zeigen, daß — ebenso wie bei Kaninchen — Fluoreszein bereits in geringerer Menge eine vorübergehende Verfärbung der Haut usw. veranlaßt, die sich besonders deutlich an der Unterbauchseite des jungen Hündchens Nr. 82 bemerkbar machte, und daß Fluoreszein und Erythrosin sich besonders dadurch voneinander unterscheiden, daß Erythrosin leicht Erbrechen hervorruft, während Fluoreszein in demselben oder in noch größeren Umfang ungiftig ist wie das Eosin. Das bei Hund Nr. 81 beobachtete Erbrechen erklärt sich dadurch, daß dem Hund im nüchternen Zustand 3 g Fluoreszein eingeführt wurden. Trotz des Erbrechens stark fluoreszeinhaltiger Flüssigkeit zeigte der 70 Minuten nach der Einführung des Farbstoffs mit mit dem Katheter entnommene Harn eine außerordentlich starke Fluoreszenz. Am nächsten Tag zeigten auch andere Hunde, die mit dem Hund Nr. 81 im Auslaufkäfig gehalten wurden und wohl vom Harn oder Kot desselben aufgenommen hatten, leuchtend gelbgrünen Harn.

Tabelle 10. Versuche an Hunden mit Einführung von Fluoreszein und Erythrosin in den Magen.

Laufende Nr.	Gewicht der Tiere in g	Dauer des Versuchs		Menge Farbstoff		Bemerkungen
		eintägig	mehrtägig	pro Kilogramm Körpergewicht berechnet g	tatsächlich mit der Schlundsonde eingeführte Menge g	
				a) Fluoreszein:		
81	♂ 8700	7. 1.	—	—	3 in 100 ccm Wasser in den leeren Magen	Erbrechen nach 25 Minuten. Trotzdem nehmen die Haut und die Schleimhäute des Auges, Mauls, des Penis zitronengelbe Färbung an. Kammerwasser des Auges fluoresziert. Harn zunächst leicht gelbgrün. 70 Minuten nach der Eingabe dunkelziegelrot, in starker Verdünnung zitronengelbgrünlich von enorm starker Fluoreszenz. Am nächsten Tag, 16 Stunden später, sind die Verfärbungen der Gewebe geschwunden.
82	♀ 3600 65 Tage alt	—	21.—23. 4.	—	1 in 50 ccm Wasser 1 „ 50 „ „ 1 „ 50 „ „	Bei jeder Farbstoffeingießung tritt nach 12 bis 20 Minuten eine mehrere Stunden andauernde ikterische Verfärbung der Haut und der Schleimhäute, sowie eine intensive Grünfluoreszenz des Kammerwassers ein. Bei der Sektion am 29. 4. war die Galle frei von Fluoreszein.
83	♀ 38000	—	21.—25. 4.	—	1 in 100 ccm Wasser 1 „ 100 „ „ 2 „ 100 „ „ 3 „ 100 „ „ 4 „ 120 „ „	Außer der typischen Verfärbung des Kots und des Harns keine besonderen Erscheinungen.
				b) Erythrosin:		
84	♀ 3100 65 Tage alt	21. 4.	—	—	1 in 50 ccm Wasser	Erbricht wiederholt nach etwa 45 Minuten; sonst keine besonderen Erscheinungen. Bei der Sektion am 8. Tag war die Galle frei von Erythrosin.
85 vergl. 83	♀ 38000	—	26.—27. 4.	—	2 in 100 ccm Wasser 3 „ 100 „ „	Am ersten Tag Harn noch fluoreszeinhaltig; am zweiten Tag rötlich gefärbter Harn. Sonst keine besonderen Erscheinungen.

4. Versuche an einer Katze.

Da beim Hunde nach Eingabe sowohl des Brom- als auch des Jodsubstitutionsprodukts des Fluoreszeins vereinzelt Erbrechen eingetreten war, wurde Eosin noch einer Katze in Lösung eingegeben. Katzen sind zur Prüfung von Stoffen, die auf Schleimhäute reizend wirken, und zur Prüfung auf eine abführende Wirkung besonders geeignet. Mengen von 3 g bis herab zu 0,5 g Eosin, je in 100 ccm Milch gelöst, wurden ohne Ausnahme erbrochen, während eine unter gleichen äußeren Bedingungen eingeführte Menge von Wasser vertragen wurde. Bei dieser Sachlage war eine etwaige Abführwirkung, an die bei der Verwandtschaft des Fluoreszeins mit dem Phenolphthalein gedacht werden mußte, nicht zu erwarten. Seitdem hat Wesenberg einer

Katze von 2 kg Körpergewicht 1,0, 0,5 und an sechs weiteren Tagen täglich 0,25 g Eosin mit der Schlundsonde eingegeben. Einmal erfolgte Erbrechen. Bereits kurz nach der Darreichung der größeren Gaben waren Haut, Ohren, Augenbindehaut deutlich rot gefärbt. Diese Erscheinungen gingen innerhalb weniger Stunden vorüber. Bei der Sektion fand sich ungefärbtes Fettgewebe vor.

Tabelle 11.

Versuche an einer Katze mit Einführung von Eosin in den Magen.

Laufende Nr.	Gewicht des Tiers in g	Dauer des Versuchs		Menge Farbstoff		Bemerkungen
		eintägig	mehrtägig	pro Kilogramm Körpergewicht berechnet g	tatsächlich mit der Schlundsonde eingeführte Menge g	
86a	3700	11. 3.	—	0,8	3,0 in 30 ccm Milch	Erbricht nach etwa 20 Minuten (am 13. 3. tritt nach Eingießung von 100 ccm Wasser in den Magen kein Erbrechen ein).
	—	14. 3.	—	0,8	3,0 in 100 ccm Milch	Erbricht nach 35 Minuten.
	—	16. 3.	—	0,54	2,0 „ 100 „ „	Erbricht nach 35 Minuten.
	—	18. 3.	—	0,54	2,0 „ 100 „ „	Erbricht.
	—	20. 3.	—	0,23	1,0 „ 100 „ „	Erbricht nach 40 Minuten.
	—	21. 3.	—	0,13	0,5 „ 100 „ „	Erbricht.
86b	3400	22. 3.	—	—	9,0 in 45 ccm Wasser unter die Haut eingespritzt	Haut- u. Schleimhautfärbung, die nach 2 Stunden noch nicht eingetreten ist, wird am Morgen nach der Einspritzung beobachtet. Fluoreszenz des Vorderkammerwassers. Eosinspektrum ist bei Ohrdurchleuchtung festzustellen. Die Gewebe sind bei der Sektion, 18 Stunden nach der Einspritzung, rot gefärbt. Harn eosinrot, Eosinspektrum i. Blutserum.

Bei der Katze lassen sich also gewisse örtliche Reizwirkungen des Eosins auf die Magenschleimhaut nachweisen, ebenso wie am Kaninchenauge bei Einstäubung von Eosin in den Bindehautsack in etwas größeren Mengen als sie A. Vogt angewendet hat, sich leicht Entzündungserscheinungen feststellen ließen, die zu Schwellung, Rötung, gesteigerter Sekretion und Verklebung der Lider führten.

5. Versuche an Fröschen und an Kaulquappen.

Weiter seien hier noch Versuche kurz besprochen, die an Fröschen und an Kaulquappen ausgeführt wurden.

Tabelle 12. Versuche an Fröschen mit Eosin und Fluoreszein.

Laufende Nr.	Gewicht des Tieres in g	Menge Farbstoff in g	Bemerkungen
		Eosin (Tetrabromfluoreszein-Natrium).	
87	Temporaria 52 g	0,4 g in 1 ccm Flüssigkeit in den Bauchlymphsack	Nach 25 Minuten beginnende Parese, Reflexverminderung, fortschreitende Lähmung. Rotfärbung. † nach $1^1/_2$ Tagen.
88	Temporaria 40 g	etwa 0,4 g in 1 ccm Flüssigkeit in den Magen	Nach $1^1/_2$ Tagen †.
		Fluoreszein.	
89	Temporaria 52 g	0,4 g in 1 ccm Flüssigkeit in den Bauchlymphsack	Nach einigen Minuten Grünfärbung des Kammerwassers des Auges. Schwimmhäute grünlich. Keine Symptome. Noch nach 40 Tagen am Leben.

Das Vergiftungsbild am Frosch entspricht dem von Jacobson und teilweise auch dem von Le Goff und Sainton gezeichneten. Die geringere Wirkungsstärke des Fluoreszeins gegenüber dem Eosin ergibt sich ohne weiteres. Besonders deutlich tritt dieser Unterschied in dem Giftigkeitsgrad aber an Kaulquappen hervor.

Tabelle 13.

Versuche an Kaulquappen mit Eosin, Fluoreszein und Erythrosin.

Die Versuche wurden in Bechergläsern mit je 1000 ccm Flüssigkeit angestellt; zu jedem Versuch dienten 12 Kaulquappen, die einem größeren Teichwasser enthaltenden und Laich, Algen usw. führenden Wasserbecken entnommen wurden und in den Farblösungen schwammen. Die Kaulquappen waren etwa 15 bis 25 mm lang und zeigten meist bereits die erste Andeutung der hinteren Extremitäten.

Die dem Licht ausgesetzten Tiere wurden am Fenster des Laboratoriums, das etwa von mittags 12 Uhr an besonnt und während der Versuchstage täglich von der Sonne beschienen war, die im Zimmer gehaltenen Tiere etwa 3 m entfernt vom Fenster hinter einer Papptafel, die im Dunkeln beobachteten Tiere auf einem verdunkelten Regal aufgestellt.

Laufende Nr.	Angewandte Konzentration der wässerigen Lösung	Aufstellungsort der Versuchstiere	Wirkung auf die Versuchstiere		
			innerhalb des ersten Tages	innerhalb des zweiten Tages	innerhalb des dritten Tages
			A. Eosin.		
90a	5,0 g in 1000 ccm	im Zimmer	nach 15 Stunden 11 † „ 21 „ 1 †	—	—
b	3,0 g „ 1000 „	„ „	—	2 †	—
c	3,0 g „ 1000 „	im Licht	nach 7 Stunden 3 †	9 †	—
d	3,0 g „ 1000 „	im Dunkeln	„ 24 „ 1 †	5 †	—
e	1,0 g „ 1000 „	im Zimmer	—	—	—

Laufende Nr.	Angewandte Konzentration der wässerigen Lösung	Aufstellungsort der Versuchstiere	Wirkung auf die Versuchstiere		
			innerhalb des ersten Tages	innerhalb des zweiten Tages	innerhalb des dritten Tages
			B. Erythrosin.		
91a	1,00 g in 1000 ccm	im Zimmer	12 †	—	—
b	0,75 g „ 1000 „	im Licht	nach 7 Stunden 2 †	10 †	—
c	0,75 g „ 1000 „	im Dunkeln	„ 7 „ 2 † innerh. 24 „ 9 †	1 †	—
d	0,50 g „ 1000 „	im Licht	nach 23 „ 3 †	1 †	nach 51 Stdn. 3 †
e	0,50 g „ 1000 „	im Dunkeln	—	—	—
f	0,10 g „ 1000 „	im Licht	—	—	—
g	0,10 g „ 1000 „	im Dunkeln	—	—	—
			C. Fluoreszein.		
92a	7 g in 700 ccm	im Zimmer	—	—	—
b	7 g „ 700 „	im Licht	nach 8 Stunden 1 †	—	—
	(Tiere und Lösung a)				
c	5 g in 1000 ccm	im Zimmer	—	—	— (desgl. 4. Tag)
d	5 g „ 1000 „	im Licht	—	—	—
	(Tiere und Lösung c)				
e	1 g in 1000 ccm	im Zimmer	—	—	—

Wiederum die geringste Giftigkeit zeigte das Fluoreszein. Untersucht wurden Mengen von 1 und 5 g in 1000 ccm und 7 g in 700 ccm Wasser. Keines der in diesen Lösungen schwimmenden Tiere starb; erst als die Tiere in der stärksten Lösung (7 g : 700 ccm) nach dreitägiger Beobachtung im Zimmer dem Sonnenlicht ausgesetzt wurden, starb innerhalb 8 Stunden 1 Tier; die übrigen blieben selbst bei zweitägigem Verweilen in dieser belichteten Lösung am Leben.

Das Eosin war in Lösungen von 1 g auf 1000 ccm auf Kaulquappen wirkungslos; größere Mengen wirkten abtötend. In Lösungen von 3 g auf 1000 ccm starben einzelne Tiere und zwar zahlreicher im Licht als im Dunkeln; doch war ein großer Unterschied nicht vorhanden. Mengen von 5 g auf 1000 ccm töteten alle Tiere im Laufe eines Tages.

An erster Stelle in der Giftigkeitsreihe steht wiederum das Erythrosin. Mengen von 0,1 auf 1000 ccm erwiesen sich im Licht wie im Dunkeln wirkungslos; in Lösungen von 0,5 g auf 1000 ccm starben einzelne Tiere im Licht; Flüssigkeiten, die 0,75 g in 1000 ccm enthielten, hatten schon eine ausgeprägte Giftigkeit. 1 g auf 1000 ccm töteten, ebenso wie 5,0 g Eosin, alle Tiere innerhalb 24 Stunden.

Die in Fluoreszein-Lösungen gehaltenen Kaulquappen wurden nach zwei Tagen in mehrfach gewechseltes Wasser übergeführt. Nach kurzer Zeit zogen sie gelbgrüne Streifen in dem Wasser nach sich, das bald die Farbe und die Fluoreszenz einer Fluoreszeinlösung annahm. Nach drei weiteren Tagen färbte sich noch immer vom ausgeschiedenen fluoreszeinhaltigen Kot und Harn der Tiere, die während der Beobachtungszeit die völlige Ausbildung der hinteren Extremitäten aufzuweisen hatten, das Wasser gelbgrün.

6. Versuche an Fischen.

Das Ergebnis einiger an frisch gefangenen (dreistacheligen) Stichlingen angestellten Versuche mit Eosin-Natrium, Fluoreszein und Erythrosin ist aus nachstehender Tabelle 14 zu ersehen.

Tabelle 14. Versuche an Fischen mit Eosin, Fluoreszein und Erythrosin.

Versuch 93 Fluoreszein	Versuch 94 Eosin-Natrium	Versuch 95 Erythrosin
a) **10 g** werden in 1000 ccm Leitungswasser gelöst.	a) **5 g** werden in 1000 ccm Leitungswasser gelöst.	a) **1 g** wird in 1000 ccm Leitungswasser gelöst.
20. 6. 8^{37} h vorm. 4 Stichlinge werden in die Lösung gesetzt.	20. 6. 8^{41} h vorm. 4 Stichlinge werden in die Lösung gesetzt. 2 h nachm. 2 Tiere †.	20. 6. 8^{45} h vorm. 4 Stichlinge werden in die Lösung gesetzt. 9^{15} h 1 Tier ist aus der Schale herausgesprungen. Tiere unruhig, schwimmen an der Oberfläche und schnappen nach Luft. Zwischen 10^{30} h und 11^{15} h vorm. Alle Tiere †.
4^{30} h. Alle Tiere lebend. In die Lösung werden Kaulquappen gesetzt.	4^{30} h nachm. Ein weiteres Tier †. In die Lösung mit dem letzten, noch lebenden Tier werd. Kaulquappen gesetzt.	4^{30} h nachm. Es wird die Lösung auf **0,5 g** in 1000 ccm verdünnt. 4 Stichlinge werden in die Lösung gesetzt.
21. 6. 8 h vorm. Alle Tiere lebend.	21. 6. 8 h vorm. Das letzte Tier † (Kaulquappen †).	21. 6. 8 h vorm. Außerhalb der Schale liegen 3 Fische †, der vierte Fisch in der Flüssigkeit ist ebenfalls †.
b) 9 h. Es werden in der Lösung nochmals 10 g Fluoreszein gelöst, so daß **20 g** in 1000 ccm gelöst sind.	b) 9 h. Es wird die Lösung auf **2,5 g** in 1000 ccm verdünnt. 4 Stichlinge werden in die Lösung gesetzt.	b) 9 h. Es wird die Lösung auf **0,25 g** in 1000 ccm verdünnt. 4 Stichlinge werden in die Lösung gesetzt.
Es verhalten sich die in 1000 ccm Leitungswasser gelösten Mengen der drei Farbstoffe zueinander wie:		
80	10	1
3^{50} h nachm. Alle Tiere lebend.	3^{50} h nachm. Alle Tiere lebend.	3^{20} h nachm. 2 Stichlinge †. 3^{30} h nachm. Der 3. Stichling †. 3^{50} h nachm. Der 4. Stichling †. Versuch beendet.
22. 6. 8 h vorm. Alle (5) Tiere lebend. 4 h nachm. Alle (5) Tiere lebend.	22. 6. 8 h vorm. Alle (3) Tiere lebend (1 Tier ist in d. nebenstehende Schale mit Fluoreszeinlösung gesprungen). 4 h nachm. Die 3 Tiere lebend.	
23. 6. 8 h vorm. 2 Tiere †. 3 Tiere leben. (5 Kaulquappen tot, 3 lebend.)	23. 6. 8 h vorm. 1 Tier † (4 Kaulquappen †, 3 lebend). Versuch abgebrochen. Einer dieser Fische stirbt in reinem Leitungswasser im Laufe des Tages.	
24. 6. 3 h. Die 3 lebenden Tiere kommen ins Bassin zurück. Versuch abgebrochen.		

Auch hier wieder der nämliche Unterschied in der Giftigkeit der 3 Farbstoffe. Wurden in den Versuchen 93b, 94b und 95b vom Erythrosin, Eosin-Natrium und Fluoreszein Mengen im Verhältnis von 1 : 10 : 80 je in 1000 ccm Leitungswasser gelöst, so zeigte sich, daß das Erythrosin (0,25 g in 1000 ccm) auf die in der Lösung

schwimmenden Fische innerhalb einiger Stunden tödlich wirkte, während Eosin (2,5 g in 1000 ccm) erst nach Tagen einzelne der Fische abtötete. In der Fluoreszeinlösung (20,0 g in 1000 ccm) starben innerhalb $1^1/_2$ bis 2 Tagen 2 Fische; 3 weitere Tiere waren noch nach drei Tagen am Leben.

Als nach $6^1/_2$stündigem Aufenhalt der Fische in der 2%igen Fluoreszeinlösung ein Tier aus der Lösung genommen wurde, zeigte es grüngefärbte Brustflossen, aber ungefärbte Augenkammern. Aus den Nasenlöchern wurde von Zeit zu Zeit Farbstoff ausgestoßen, der das Wasser intensiv färbte, ebenso wie der farbstoffhaltige Harn und Kot des Tieres. Nach eintägigem Aufenthalt erwiesen sich die 5 Fische als ganz verschieden grün gefärbt; auch diese verbreiteten aus den Nasenlöchern Farbstraßen.

Jodlbauer und Busck, die die Wirkungen der nämlichen drei Farbstoffe in 0,5 bis 0,05%ige Lösungen auf Bitterlinge (Rhodeus amarus) untersuchten, fanden die Giftigkeit des Eosins und des Erythrosins in 0,5%iger Lösung etwa gleich groß wie in vorstehenden Versuchen an Stichlingen. Nur erwies sich eine 0,05%ige Erythrosinlösung auf Bitterlinge als unwirksam, während eine solche für Stichlinge noch stark wirksam war, und es starben die Bitterlinge bereits in 0,1%iger Fluoreszeinlösung nach 12 Stunden, während Stichlinge in 1%iger Lösung dieses Farbstoffs nicht und in 2%iger Lösung nur in geringem Grade beeinflußt wurden. (In den Versuchen Jodlbauers und Buscks wurden die Fische anscheinend in schmalen Glasgefäßen gehalten.)

7. Versuche über die Ausscheidung des Eosins.

Wie schon bei einzelnen Kaninchen und Hunden, wurde auch an der unter 4 erwähnten Katze die Ausscheidung des eingeführten Eosins verfolgt. Um einen Anhaltspunkt dafür zu haben, welche Mengen Eosin in der Galle aufgespeichert werden, wurde der Katze eine sehr große Menge Eosin, 9 g in 45 ccm Wasser unter die Haut gespritzt; 12 Stunden später wurde das Tier durch tiefes Chloroformieren getötet und nicht nur die Gallenblase mit Inhalt, sondern auch der in der Harnblase vorgefundene Harn, die Leber und die Nieren auf Eosin untersucht.

Die Eosinbestimmungen ergaben bei dieser Katze folgende Werte für den Gehalt an Eosin:

in der Gallenblase einschl. Inhalt	0,0071 g
im Harn (50 ccm)	0,0059 g
in der Leber (83,5 g)	0,0033 g
in den Nieren (27,8 g)	0,0008 g

Bei dieser Gelegenheit seien auch die Ergebnisse der an den Kaninchen Nr. 55 und 56 angestellten Versuche, bei denen absichtlich ganz außerordentlich hohe Mengen Eosin (5 g auf 1 kg Körpergewicht) in den Magen eingeführt wurden, erwähnt.

Es wurden gefunden:

bei Kaninchen Nr. 55:	im Inhalt der Gallenblase (1,3 g)	0,0141 g
	in der Leber (131 g)	Spuren
	in den Nieren (23 g)	0,0030 g
bei Kaninchen Nr. 56:	in der Leber einschließlich der ausgelaufenen Galle (42 g)	0,0055 g.

Diese Versuche zeigen, daß die in den Organismus übertretenden Mengen Eosin außerordentlich klein sind; bei Versuch Nr. 55 sind in der Leber, den Nieren und in der Galle rund 18 mg Eosin gefunden worden, das würde zum Zeitpunkt der vorgenommenen Untersuchung von der in den Magen eingeführten Menge von 18 g Eosin 0,1 % sein.

Um über die Ausscheidungsverhältnisse ein näheres Urteil zu erlangen, wurden auch einige Versuche an Menschen angestellt, bei denen zugleich auch der Zweck verfolgt wurde, den Eintritt und den Verlauf der Ausscheidung des Eosins mit dem Harn zeitlich zu bestimmen und die Identifizierung des zur Ausscheidung gelangenden Farbstoffes vorzunehmen.

Tabelle 15. Versuche an Menschen mit Eosin.

Laufende Nr.	Datum des Versuchs	Versuchsperson	Menge Eosin in g eingenommen	Bemerkungen
96	22. 12.	Dr. F.	0,1	Vormittags 7 Uhr mit dem ersten Frühstück in Oblaten genommen.
97	5. 1.	Dr. F.	0,25	desgl.
98	13. 6.	Dr. F.	1,0	Tetrabromfluoreszein [1]), desgl.
99	16. 8.	Dr. R.	1,2	Tetrabromfluoreszein [1]), 10^{50} vormittags mit dem zweiten Frühstück in Oblaten genommen.
100	20. 8.	A.	1,5	Tetrabromfluoreszein [1]), 1^{30} nachmittags mit dem Mittagbrot in Oblaten genommen.
101	20. 8.	Dr. F.	2,0	Tetrabromfluoreszein [1]), mit dem ersten Frühstück in Oblaten genommen.

Der Gang der Ausscheidung war bei dem Versuch Nr. 99 folgender. Die nach 15 und 40 Minuten entleerten Harnproben zeigten keinerlei Eosinfärbung, auch keinen grünen Lichtkegel. Nach 60 Minuten begann die Grünfluoreszenz und war nach $2^1/_4$ Stunden deutlich. Nach 4 Stunden zeigte der grünfluoreszierende Harn die typische Rosafärbung, die auch nach $11^3/_4$ Stunden noch zu sehen war. Nach $19^3/_4$ Stunden war die Rotfärbung, aber nicht die Grünfluoreszenz geschwunden. Nach 48 Stunden fluoreszierte der Harn nur noch ganz schwach. Der 20 Stunden nach der Eosineinnahme entleerte Kot war im Anfangsteil noch ungefärbt, im Endteil stark rot. Der Kot des zweiten Tages war durchweg rot gefärbt, der des dritten Tages in seinem Endteil bereits braun und frei von Eosin.

Im wesentlichen gleich verlief der Versuch Nr. 97 mit einer wesentlich niedrigeren Menge Eosin an einer anderen Versuchsperson, bei dem das Vorhandensein von Eosin im Harn spektroskopisch nachgewiesen wurde (vergl. Fig. 1). Die 75, 90 und 120 Minuten nach der Eosineinnahme entleerten Harnproben zeigten im Spektogramm

[1]) Die zu analytischen Zwecken aus dem Kaliumsalz rein dargestellte Säure. Das hierzu benutzte Eosin (Tetrabromfluoreszeinkalium) enthielt 10,81 % Wasser und ergab beim Ausschütteln der angesäuerten Lösung mit Äther 79,61 % Tetrabromfluoreszein; theoretisch enthält Tetrabromfluoreszeinkalium ($C_{20}H_6Br_4O_5K_2$, $5\,H_2O$) · 11,06 % Wasser und 80,10 % Tetrabromfluoreszein.

bei der von Rost, Franz und Heise[1]) beschriebenen Versuchsanordnung (Schichtdicke, Lichtquelle, Expositionszeit, Spaltweite usw.) einen stetig an Intensität zuzunehmenden für Eosin charakteristischen Absorptionsstreifen, nach 10 und 50 Minuten wies der Harn diesen noch nicht auf. Nach 20½ Stunden enthielt der Harn — bei unveränderter Versuchsanordnung untersucht — noch spektroskopisch nachweisbare Mengen Eosin.

Die im Versuch Nr. 99 während 2 Tage gesammelten Harnmengen wurden zur Ermittelung der Menge des Eosins in folgender Weise chemisch verarbeitet.

Der auf 1 l eingeengte Harn wurde nach dem Versetzen mit Säure (Phosphorsäure) mit Äther 4 Tage lang in einem selbsttätigen Extraktionsapparat ausgezogen; sodann wurde der ätherische Auszug nach dem Trocknen mit absolutem Alkohol aufgenommen, die alkoholische Lösung filtriert und nach dem Eindampfen und Trocknen zur Halogenbestimmung in der üblichen Weise im einseitig geschlossenen Rohr über Kalk verbrannt. Dabei wurden 0,307 g Halogensilber gefunden. Eine Umrechnung auf Brom bezw. Eosin ist aber nicht angängig, weil ein Vergleichsversuch mit 2 l Harn von Menschen, die kein Eosin aufgenommen hatten, Werte ergab, die für den Halogengehalt des normalen Harns sogar noch höher waren als die genannte Zahl von 0,307 g. Zweifellos enthielt aber der Harn der Versuchsperson Nr. 96 Eosin, wie die rosarote Färbung bewies; im Zusammenhalt mit den Ergebnissen der vorher erwähnten Kaninchenversuche kann aber aus diesem Ergebnis geschlossen werden, daß die Mengen des im vorliegenden Fall in den Harn übergetretenen Eosins sehr gering gewesen sind.

Bei dem Versuch Nr. 98 wurde ebenfalls der Harn auf seinen Eosingehalt, und zwar nach demselben Verfahren, untersucht. Jedoch wurde nur 2mal 6 Stunden lang extrahiert (diese Zeit genügte zur Extraktion, da bei einer eingedampften Probe des ätherischen Auszugs durch Zusatz von Ammoniak keine Rotfärbung mehr hervorgerufen werden konnte). Dabei wurden gefunden im Harn der ersten 24 Stunden 0,011, in dem der zweiten 24 Stunden 0,0084 g Halogensilber.

Von diesem Versuch (Nr. 98) wurde auch der Kot dreier Tage untersucht. Es wurde jedesmal die Hälfte der Kotproben zur Analyse verwendet; sie wurden mit Sand verrieben und mehrmals mit je 200 ccm absolutem Alkohol am Rückflußkühler auf dem Wasserbad ausgekocht, und zwar solange, bis der Alkohol kaum noch sich färbte. Der Rückstand des Alkoholauszuges wurde mit Kalk zur Halogenbestimmung im einseitig geschlossenen Rohr verbrannt. Die dabei gewonnenen Zahlen waren folgende:

im Kot der ersten 24 Stdn.	(22 g Trockensub.)	wurden gefunden	0,2290 g	Halogensilber
„ „ den zweiten 24 „	(47 g „)	„ „	0,7262 g	„
„ „ „ dritten 24 „	(33 g „)	„ „	0,1696 g	„
im Kot dreier Tage	(102 g Trockensub.)		1,1248 g	Halogensilber

Da in 102 g getrocknetem Normalkot derselben Versuchsperson 0,1940 g Halogensilber gefunden wurden, so verbleiben für das auf das eingeführte Eosin zu beziehende Halogensilber (Silberbromid) etwa 0,9 g.

[1]) Rost, Franz und Heise, Beiträge zur Photographie der Blutspektra usw. Diese Arb. Bd. 32, 1909, S. 223 (und Sonderdruck, Verlag von J. Springer-Berlin).

Hieraus würde sich berechnen, daß in diesem Versuch etwa 80% des eingeführten Eosins unresorbiert mit den Darmentleerungen den Körper wieder verlassen haben.

Diese aus den Versuchen an Menschen gewonnenen Werte können aber nur einen beschränkten Anspruch auf Genauigkeit machen, da das Eosin in sehr großen Mengen organischer Substanz (des Harns und Kots) zu bestimmen war, die angewendete Methode aber zur Brombestimmung in solch großen Mengen organischer Substanz nicht geeignet ist.

Bei Anwendung des Verfahrens der Verbrennung mit Natronkalk im Verbrennungsrohr unter Durchleiten von Sauerstoff gelingt es zwar, auch größere Mengen — bis 10 g — trockenen Kots so zu verbrennen, daß der Natronkalk weiß erscheint; den Austritt von brenzlich riechenden Dämpfen zu vermeiden, ist jedoch auch dann nur möglich, wenn man die Verbrennung außergewöhnlich langsam vor sich gehen läßt, so daß sie in einem Tage nicht zu Ende geführt werden kann. Wurde aber die Verbrennung unterbrochen, so zersprangen die durch das Alkali angegriffenen Röhren beim Erkalten in den meisten Fällen; auch der Ersatz des Natronkalkes durch ein Gemisch von gleichen Teilen Natronkalk und Ätzkalk konnte diesen Übelstand nicht beheben.

Diese orientierenden Versuche wurden mit Kotmengen von 5 g und mehr Trockenmasse, denen abgewogene Mengen Eosin zugesetzt worden waren, ausgeführt. In den Fällen, in denen die Verbrennung anscheinend glatt vor sich gegangen war (das aus dem Rohre austretende Gasgemenge war jedoch niemals ganz geruchfrei), wurde der Inhalt der Röhre nach der Verbrennung in verdünnter Salpetersäure gelöst, die Lösung filtriert und darin das Gesamthalogen mit Silbernitrat gefällt. Die Filtration der Lösung des Verbrennungsrückstandes, wie auch das Abfiltrieren des Halogensilbers ging wegen der aus dem Glase der Röhre stammenden, schleimig sich ausscheidenden Kieselsäure ebenfalls meist nur sehr langsam von statten; einige Male war das Sammeln des Halogensilberniederschlages überhaupt nicht möglich. Das Halogensilber wurde entweder durch Schmelzen mit Kalium-Natriumkarbonat zerlegt, die Schmelze mit Wasser aufgenommen und aus der vom Silber abfiltrierten Lösung des Chlor- und Bromalkalis nach dem Verfahren von Jannasch (Gewichtsanalyse, Leipzig 1897, S. 285) das Brom ausgetrieben und als Bromsilber bestimmt, oder das Halogensilber wurde im Chlorstrom erhitzt nnd das Brom aus der Differenz berechnet. Dies letztere Verfahren wurde in der von H. Emde[1]) empfohlenen Weise ausgeführt, die eine sehr zweckmäßige Abänderung der ursprünglichen Methode[2]) darstellt.

Bei allen diesen Versuchen wurde jedoch stets nur ein Teil des in dem Eosin enthaltenen Broms erhalten. Es ergab sich also, daß auf diese Weise genügend zuverlässige Werte nicht zu erlangen sind, wenn wegen des geringen Eosingehaltes so große Mengen von organischer Substanz, wie 5 g, in Arbeit genommen werden müssen.

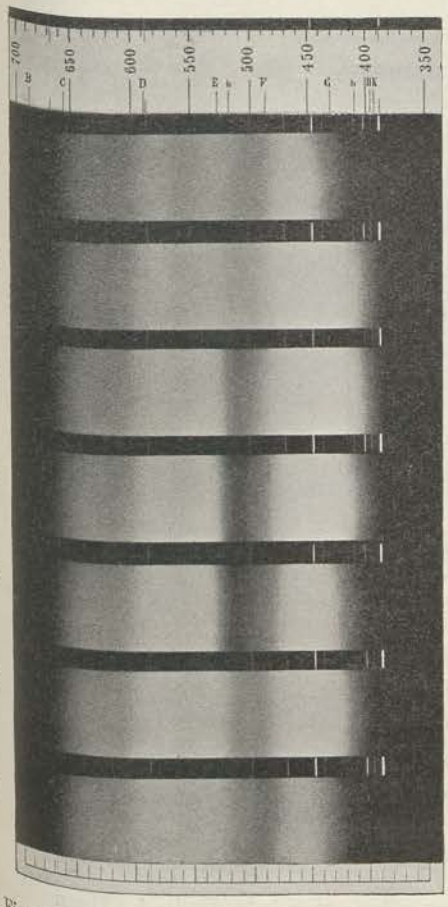
Dagegen sind die in den Versuchen an den Kaninchen Nr. 55 und 56 und an der Katze (Versuch Nr. 86) gewonnenen Zahlen fast durchweg aus Analysen mit so niedrigen Substanzmengen erhalten, daß die auf S. 197 mitgeteilten Werte zur Beurteilung

[1]) Chem. Zeitg. 1911, Bd. 35, S. 452.
[2]) Fresenius, Quant. Analyse I, S. 655.

des in den Organismus aufgenommenen und aus ihm wieder ausgeschiedenen Eosins herangezogen werden dürfen.

Das Eosin andererseits durch ein Lösungsmittel aus organischen Substanzmengen, wie z. B. dem Kot, herauszulösen und solches etwa zur Wägung zu bringen, würde nicht durchführbar sein, da eine Trennung des Eosins von den mit in die Lösungsmittel (Alkohol, Äther) übergehenden sonstigen organischen Stoffen nicht möglich ist.

Bei den Versuchen, die Ellinger und Kotake[1]) über den Gehalt des Harns an Brom nach Eingabe anorganischer und organischer Bromverbindungen anstellten, handelte es sich in erster



Versuchsharn nach:

1 10 Min.

2 50 Min.

3 75 Min.

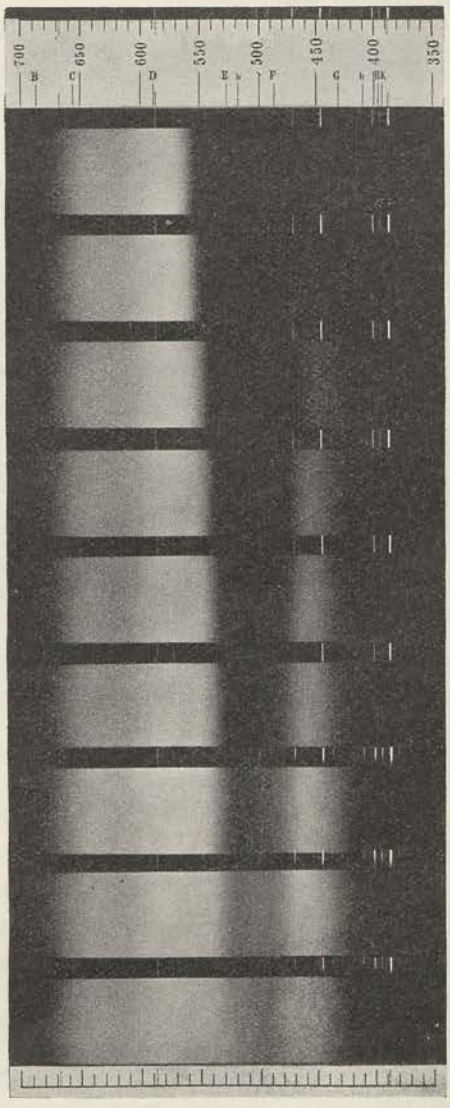
4 90 Min.

5 120 Min.

6 9 Std.

7 $20^1/_2$ Std.

Fig. 1. Photogramm der Spektren der nach 10 Minuten bis $20^1/_2$ Stunden nach Einnahme von 0,25 g Eosin (Versuch Nr. 97) entleerten Harne.



Konzentration:

1

2 1 : 5 000

3 1 : 10 000

4 1 : 25 000

5 1 : 50 000

6 1 : 75 000

7 1 : 100 000

8 1 : 250 000

9 1 : 500 000

10 1 : 1 000 000

Fig. 2. Photogramm der Spektren von Lösungen von Eosin in Menschenharn in Konzentration von 1 : 5 000 bis 1 : 1 000 000; sogenannte Konzentrationsreihe. Nr. 1: Nachträglich aufgedruckte Wellenlängenskala[2]).

[1]) Ellinger und Kotake, Die Verteilung des Broms im Organismus nach Darreichung anorganischer und organischer Brompräparate. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol., Bd. 65, 1911, S. 87.

[2]) Desgleichen bei den nachfolgenden Spektrogrammen.

Linie um die Feststellung der Menge Brom, die sich als Bromid im Harn vorfand. Diese läßt sich durch einfache Veraschung genau ermitteln. Die Bestimmung der Menge unzersetzter organischer Bromverbindung ist von diesen Autoren nur in je einem Versuch mit Zimtesterbromid und mit Sabromin (dibrombehensaures Kalzium) durch Veraschen des Ätherextrakts vorgenommen worden; die erhaltenen Werte werden von ihnen zutreffend als Minimalwerte bezeichnet, da bei der Analysierung mit Verlusten zu rechnen ist.

Auch eine Vergleichung der Intensität des Absorptionsbandes, z. B. von Harn nach Einnahme von Eosin, im Spektrogramm mit den Absorptionsverhältnissen von Eosin-Harnlösungen hatte keinerlei verläßliches Ergebnis.

In der vorstehenden Figur 1 ist der spektrale Befund des Harns der Versuchsperson Dr. Fr. (Versuch Nr. 97, 0,25 g Eosin) wiedergegeben; zum Vergleich

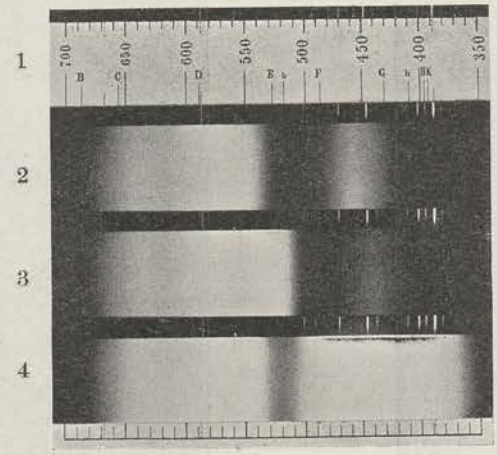


Fig. 3. Photogramm der Spektren von wässerigen Lösungen von Eosin (Nr. 2), Fluoreszein (Nr. 3) und Erythrosin (Nr. 4) in der Konzentration 1 : 100 000.

ist in Fig. 2 eine Reihe von Spektrophotogrammen daneben gestellt, die die Absorptionsverhältnisse von verschieden starken Konzentrationen von Lösungen des Eosins in Menschenharn wiedergeben[1]). Hieraus ergibt sich jedenfalls, daß selbst in den Harnportionen, die die größte Menge Eosin enthalten, dieser Farbstoff höchstens in Konzentrationen war, die 1 : 250000 bis 1 : 500000 entsprechen. Nimmt man selbst an, daß in dem während 20½ Stunden entleerten Harn durchweg die im Harn nach 120 Minuten vorhandene Eosinmenge enthalten gewesen wäre, so würde die in 1 l Harn ausgeschiedene Menge auf etwa 2 bis 4 mg Eosin zu schätzen sein.

Die vorstehende Fig. 3 zeigt die Absorptionsbanden der drei Farbstoffe in der nämlichen Konzentration, 1 : 100000. Um einen besseren Vergleich zu ermöglichen, sind die Absorptionsspektren des Fluoreszeins, Eosins und Erythrosins, außerdem je

[1]) Die beigefügten spektrographischen Aufnahmen sind im Pharmakologischen Laboratorium des Kaiserl. Gesundheitsamts von Herrn Dr. med. Fr. Franz ausgeführt worden.

in einer Konzentrationsreihe photographisch aufgenommen worden (vergl. die nachstehenden Figuren 4—6).

Die verschiedene Lage und Intensität der Absorptionsbänder dieser 3 Farbstoffe ergibt sich hieraus ohne weiteres; in wässeriger Lösung zeigen sie eine geringere Intensität als in Harn. Bei Erhöhung der Schichtdicke, Verstärkung der Lichtquelle, Veränderung der Expositionszeit usw. hätte sich ohne Zweifel auch bei den schwächeren

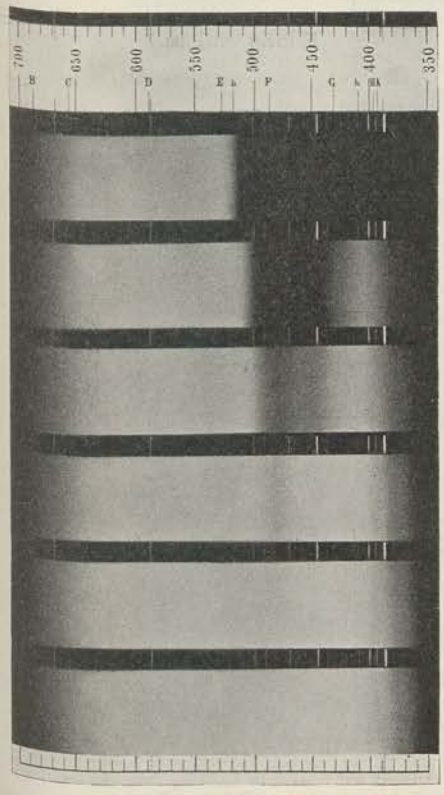


Fig. 4. Fluoreszein. Photogramm der Spektren von wässerigen Lösungen von Fluoreszein in den Konzentrationen 1:10000 bis 1:1000000.

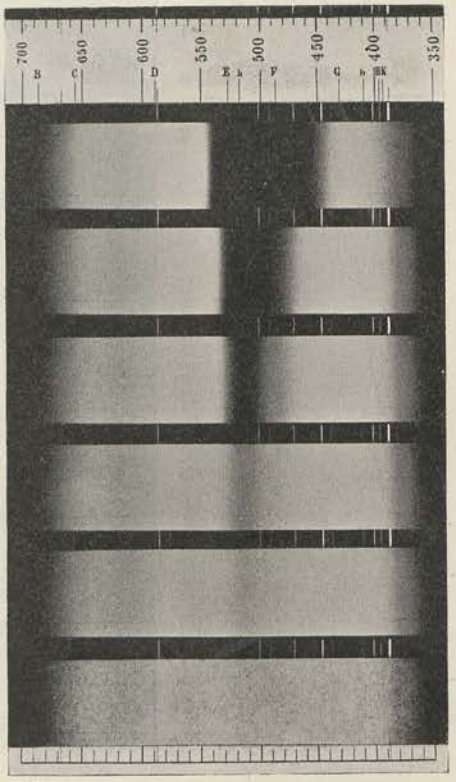


Fig. 5. Eosin. Photogramm der Spektren von wässerigen Lösungen von Eosin in den Konzentrationen 1 : 10000 bis 1000000.

Konzentrationen noch das Absorptionsband auf der photographischen Platte fixieren lassen. Es wurde aber absichtlich an der Versuchsgestaltung, wie sie von Rost, Franz und Heise bei der Photographie des Blutspektrums eingehalten worden war, des Vergleichs wegen nichts abgeändert.

Die verwendeten Farbstoffe zeigten in wässerigen Lösungen nach Messungen mit dem Spektrometer (der Firma Schmidt & Haensch in Berlin) das Maximum der Absorption bei:

Eosin . . . . . $\lambda = 515\ \mu\mu$
Fluoreszein[1]) . . . . . $\lambda = 490—489\ \mu\mu$
Erythrosin . . . . . $\lambda = 522\ \mu\mu$

[1]) Anm. bei der Korrektur: L. Lewin (Obergutachten über Unfallvergiftungen 1912, S. 330) gibt an, daß der Absorptionsstreifen des Fluoreszeins nach seinen Messungen bei Wellenlänge 488 liegt.

Noch nach einer weiteren Richtung lassen sich aus der vorliegenden spektrographischen Untersuchung Schlüsse ziehen. In keinem der untersuchten Fälle konnte nämlich eine Umwandlung von Eosin in Fluoreszein nachgewiesen werden; die Figur 7 zeigt, daß sowohl im Harn wie auch in der Galle das von uns beobachtete Absorptionsband dasjenige des Eosins war.

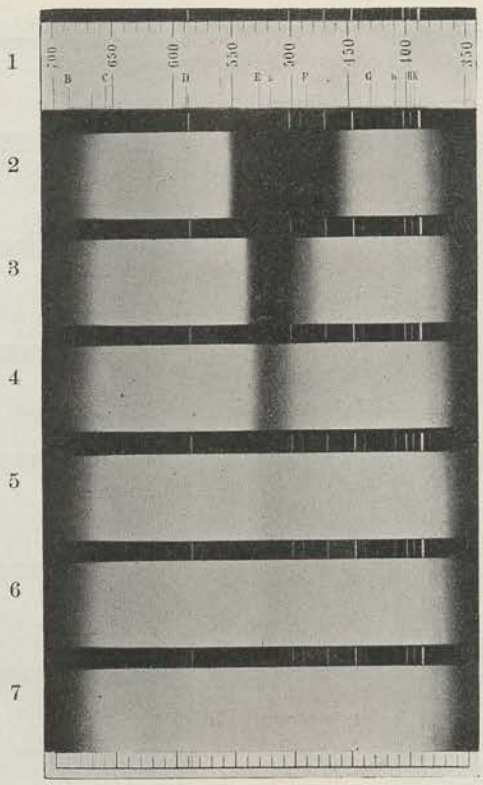


Fig. 6. Erythrosin.
Photogramm der Spektren von wässerigen Lösungen von Erythrosin in den Konzentrationen 1 : 10 000 bis 1 : 1 000 000.

Anmerkung bei der Korrektur: Nachträglich wurde noch ein Versuch mit Fluoreszin (Präparat der Firma Meister, Lucius & Brüning in Höchst am Main) am Hund angestellt. Die Säure Fluoreszin, $C_{20}H_{14}O_5$, $O\langle{}^{C_6H_3 \cdot OH}_{C_6H_3 \cdot OH}\rangle C\langle{}^{C_6H_4 \cdot COOH}_{H}$ bildet sich beim Erwärmen von Fluoreszein, $C_{20}H_{12}O_5$, mit Natronlauge und Zinkstaub; durch Oxydationsmittel wird die Säure wieder in das Fluoreszein übergeführt. Einem Hund von 8800 g Körpergewicht wurden 5 g Fluoreszin in Fleisch eingehüllt eingegeben. Der 45 Minuten später entleerte Harn war grüngelb gefärbt, fluoreszierte und zeigte etwa die spektralen Absorptionserscheinungen des Fluoreszeins. Das Maximum der Absorption war nicht scharf zu bestimmen; es lag bei $\lambda = 492—490\ \mu\mu$. (Lewin [a. a. O.] fand im Harn eines Kaninchens, dem 3 g Fluoreszin in den Magen

eingeführt worden waren, den Absorptionsstreifen bei der Wellenlänge 488.) Der 90 Minuten nach der Fluoreszineingabe entleerte Kot war in seinen letzten Anteilen grünlich gefärbt; ein wässeriger Auszug des Kots zeigte das für Fluoreszein charakteristische Absorptionsband zwischen Grün und Blau. Keine Gelbfärbung der Haut, der Schleimhäute und des Kammerwassers, wie bei den Versuchen mit Fluoreszein-

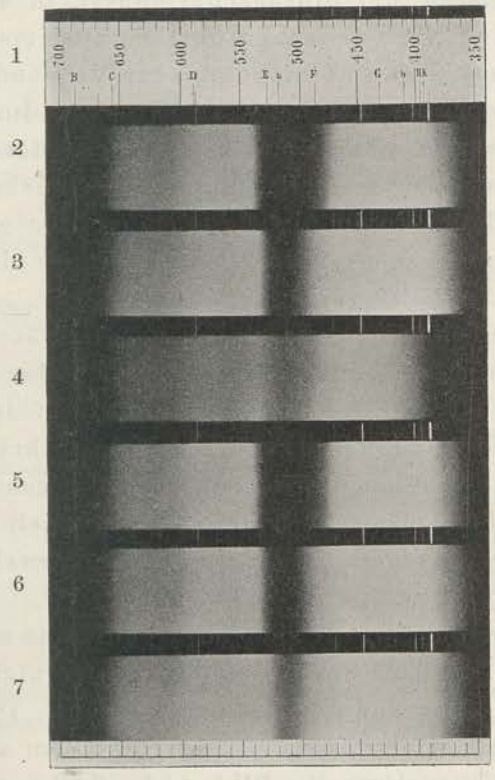


Fig. 7. Photogramm der Spektren von Galle und Harn eines Hundes und eines Kaninchens, denen Eosin in den Magen eingeführt worden war.

eingießung. Der Hund zeigte keinerlei krankhafte Erscheinungen. Harn und Kot war noch einige Tage lang grüngelb gefärbt. Der 6 Tage nach der Fluoreszineingabe mit dem Katheter der Blase entnommene Harn erwies sich frei von Fluoreszein.

III. Schlußergebnisse.

Das Ergebnis vorstehender pharmakologischer Untersuchungen läßt sich folgendermaßen zusammenfassen.

1. Das Eosin wird zum bei weitem größten Teil vom Magendarmkanal aus überhaupt nicht resorbiert; nur ein kleiner Teil tritt in den Organismus über.

2. Das Eosin entfaltet bei den untersuchten Tierarten und unter den eingehaltenen Versuchsbedingungen keine spezifischen — weder örtlichen

noch allgemeinen — Wirkungen, die gestatten würden, es in bekannte pharmakologische Gruppen einzureihen oder ihm überhaupt bestimmte Affinitäten zu einzelnen Organsystemen (Nervensystem, Kreislauf, Darm) zuzuschreiben; ihm kommt überhaupt eine nennenswerte Giftigkeit auf das Tier nicht zu. Hunde mit Eosin vom Magen aus zu töten, ist nicht möglich gewesen. Auch bei langdauernder Verfütterung von Eosin traten Schädigungen der Funktionen der Nieren, der Blutbeschaffenheit, in der Temperaturregulierung usw. nicht ein. Nach der ausgeführten experimentellen Prüfung kann dieser Verbindung eine pharmakologische Verwandtschaft mit der ihr chemisch nahestehenden Triphenylmethanverbindung Phenolphthalein oder mit dem Resorzin oder der Phthalsäure, deren gebromtes Kondensationsprodukt das Eosin darstellt, nicht zugeschrieben werden. Auch Salzwirkungen sind beim Eosin nicht zu beobachten gewesen; dieses besitzt demgemäß eine noch geringere Giftigkeit als das die Salzwirkungen in ausgesprochener Weise zeigende Kochsalz.

3. Das Eosin bewirkt — entsprechend seiner geringen Affinität zu den Zellipoiden — nur bei Einfuhr sehr großer Mengen in den Magen eine Rosafärbung der Gewebe; diese ist nur eine mitgeteilte und auf den Farbstoffgehalt der die Gewebe durchziehenden Blutgefäße zurückzuführen. Die Verfärbung ist flüchtig und geht vorüber. In ihren physiologischen Funktionen geschädigte oder absterbende Gewebe nehmen dagegen leicht den Farbstoff auf. In allen Fällen erwiesen sich Fett- und Nervengewebe als am wenigsten gefärbt.

4. Der resorbierte Anteil des Eosins verteilt sich im Organismus so, daß der Farbstoff in der Galle eine gewisse Speicherung erfährt, nicht aber in die Milch säugender Hunde oder auf die Foeten übergeht. Die Ausscheidung des resorbierten Eosins erfolgt in unveränderter Form als Eosin; auch die spektroskopische Untersuchung des Blutes, der Galle und des Harns hat ergeben, daß eine Bromabspaltung aus dem Molekül des Eosins und ein Übergang des Eosins in Fluoreszein nicht erfolgt.

5. Die Muttersubstanz des Eosins, das Fluoreszein, und dessen Jodsubstitutionsprodukt, das Erythrosin, verhalten sich nach den angestellten Vergleichsversuchen im wesentlichen ebenso im Organismus wie das Eosin und sind pharmakologisch ähnlich zu beurteilen. Nur daß das Fluoreszein eine noch geringere Wirksamkeit zeigt als sein Brom- und Jodsubstitutiosprodukt. In Frosch- und Kaulquappen- sowie in Fischversuchen macht sich dieser Unterschied zwischen Eosin und Fluoreszein besonders deutlich bemerkbar. Das Eosin wiederum steht in der Intensität der Wirkung erheblich hinter dem Erythrosin zurück. Durch die Halogensubstitution wird die Wirkungsstärke des Fluoreszeins daher erhöht im Bromprodukt (Eosin), noch mehr aber im Jodprodukt (Erythrosin). Fluoreszin wird im Organismus des Hundes in Fluoreszein übergeführt und im Harn als solches ausgeschieden.

6. Die pharmakologischen Versuche lehren somit ebenso wie die Fütterungsversuche an Schweinen, Geflügel usw., daß keine Anhaltspunkte für die Annahme vorliegen, daß das Eosin selbst in größeren Mengen, als sie zum Färben der ausländischen Futtergerste verwendet werden, giftige oder auch nur schädliche Wirkungen auf den tierischen Organismus zu entfalten vermag.

Literatur.

Grandhomme, Die Teerfarben-Fabriken der Herren Meister, Lucius & Brüning zu Höchst a. M. in sanitärer und sozialer Beziehung. Vierteljahrsschr. f. gerichtl. Medizin. Neue Folge. Bd. 32, 1880, S. 280. Auch Sonderschrift; 2. Auflage 1883, 3. Auflage 1893.

P. Ehrlich, Über provozierte Fluoreszenserscheinungen am Auge. Deutsche med. Wochenschr. 1882, S. 21.

A. Beckh, Über die antibakteriellen Wirkungen einiger Anilinfarbstoffe. Diss. Erlangen (unter Penzoldts Leitung) 1888.

Ed. Richter, Über Resorptionsverhältnisse für verschiedene Körperregionen, geprüft mittels Eosinlösungen. Hab.-Schrift, Greifswald 1895.

L. Lewin, Lehrbuch der Toxikologie 1897, S. 231.

Rich. Meyer, Über einige Beziehungen zwischen Fluoreszenz und chemischer Konstitution. Zeitschr. f. physikal. Chem. Bd. 24, 1897, S. 468.

Le Goff und Sainton, Recherches expérimentales sur l'éosine. Progrès médical 1898, I, S. 51.

J. Prime, Des accidents toxiques produits par l'éosinate de sodium. Thèse Paris 1900.

E. Overton, Studien über die Aufnahme der Anilinfarben durch die lebende Zelle. Jahrb. f. wissensch. Botanik Bd. 34, 1900, S. 669 (690).

v. Tappeiner, Über die Wirkungen fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Raab. Münchn. med. Wochenschr. 1900, S. 5, desgl. Zusammenfassung und Literaturzusammenstellung in v. Tappeiner, Die photodynamische Erscheinung (Sensibilisierung durch fluoreszierende Stoffe). Ergebnisse der Physiologie, 8. Jahrg., 1909, S. 698.

Wessely, Über die Fluoreszenzerscheinungen am Auge und die Ausscheidung des Fluoreszeins aus dem Körper. Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1903, S. 548.

W. Straub, Über chemische Vorgänge bei der Einwirkung von Licht auf fluoreszierende Substanzen (Eosin und Chinin) und die Bedeutung dieser Vorgänge für die Giftwirkung. Münchn. med. Wochenschr. 1904, Nr. 25, und Über den Chemismus der Wirkung belichteter Eosinlösung auf oxydable Substanzen. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 51, 1904, S. 383.

A. Heffter, Über die bei der Autoxydation des Eosins entstehenden Produkte. Berichte der D. Chem. Gesellsch., Jahrg. 38, 1905, S. 3633.

Jodlbauer und Busck, Über die Wirkung von Fluoreszein uud Fluoreszeinderivaten im Lichte und im Dunkeln. Arch internat. de pharmacodyn. et de thérap. Bd. 15, 1905, S. 263.

A. Vogt, Experimentelle Untersuchungen über die Bedeutung der chemischen Eigenschaften der basischen Anilinfarbstoffe für deren schädliche Wirkung auf die Augenschleimhaut. Zeitschr. f. Augenheilkunde Bd. 15 und Weitere experimentelle und klinische Uutersuchungen über den schädlichen Einfluß von künstlichen Anilinfarben auf das Auge. Diss. Basel 1905.

Kastle, The conduct of phenolphthalein in the animal organism. Treas. Departm. Public. Health and Mar. Hosp. Service. Hyg. Lab. Washington Bull. 26, 1906, S. 23.

van Itallie, Übergang von Arzneimitteln in Milch. Pharmaceut. Weekblad. Bd. 45, 1908, S. 1357, zitiert nach Chem. Zentralbl. 1908, II, S. 1742.

Jamada und Jodlbauer, Über das Resorptionsvermögen der Haut für Anilinfarbstoffe usw. Arch. internal. de pharmacodyn. et de thérap. Bd. 19, 1909, S. 215.

E. Cooke und L. Loeb, Über die Giftigkeit einiger Farbstoffe für die Eier von Asterias und von Fundulus. Biochem. Zeitschr. Bd. 20, 1909, S. 167.

Wesenberg, Der Übergang der Arzneimittel in die Milch und des Nahrungsfettes in das Körperfett. Zeitschr. f. angew. Chem. Bd. 23, 1910, S. 1347.

Koldewijn, Übergang von Arzneimitteln in die Milch. Arch. d. Pharmazie Bd. 248, 1910, S. 623.

A. Burk, Die klinische, physiologische und pathologische Bedeutung der Fluoreszenz im Auge nach Darreichung von Uranin. Klin. Monatsbl. f. Augenheilkde. Bd, 48, 1910, S. 445.

Fehr, Über die Färbung entzündeter Augen durch innerlichen Gebrauch von Uranin. Medizin. Klinik 1911, S. 529.

Miessner, Fütterungsversuche mit Eosingerste an Schweinen und toxikologische Versuche über die Wirkung des Eosins bei verschiedenen Tieren. Mitt. des Kaiser Wilhelm-Instituts für Landwirtsch. in Bromberg Bd. 3, 1911, Heft 4.

Nachtrag: In dem am 18. April 1912 ausgegebenen Heft 5 des 58. Bandes der Zeitschr. f. Biol. veröffentlicht Garmus seine unter L. Ashers Leitung angestellten Untersuchungen über die Permeabilität der Drüsenzellen (Froschnickhaut) für Farbstoffe und berichtet, daß sich ihm Eosin als stark giftig für Frösche erwiesen habe. Es wurde Grüblers wasserlösliches Eosin Fröschen, deren Gewicht nicht notiert wurde und die in einem vor Licht geschützten Trog gehalten wurden, in den Lymphsack eingespritzt (Briefliche Mitteilung des Herrn Prof. Dr. L. Asher) „1 ccm ganz verdünnter Eosinlösung“ tötete einen Frosch nach 5 bis 10 Minuten, „1 ccm ($^1/_{5000}$) Eosinlösung“ (d. h. 0,2 mg) nach $4^1/_2$ Stunde, „1 ccm (ganz dünner, durchsichtiger) Eosinlösung“ machte einen Frosch nach 40 Minuten halbtot; hiernach würde dem Eosin etwa die Giftigkeit des Strychnins zukommen.

Diese Angaben ließen eine Erweiterung der auf S. 193 beschriebenen Versuche erwünscht erscheinen. Sie wurden an frisch gefangenen Eskulenten so angestellt, daß verschiedene Mengen sowohl der Kalium- als auch der Natriumverbindung in 1 bis 10%iger Lösung in den Bauchlymphsack injiziert wurden. Die Frösche wurden im zerstreuten Tageslicht unter Glasglocken beobachtet. Die Angaben „†“ und „—“ sind so zu verstehen, daß entweder der Tod nach vorausgegangenen Lähmungserscheinungen innerhalb der angegebenen Zeit eintrat oder daß innerhalb 4 Tagen jede Wirkung ausblieb.

Tabelle 16. Versuche an Fröschen mit Eosin.

Gewicht der Frösche	Konzentration der angewandten Lösung	Menge eingespritzt, pro 100 g Tiergewicht berechnet
Eosinkalium:		
I. 44 g, 18 g, 13 g	1 %ig	23 mg: — ; 56 mg: — ; 77 mg: —
II. 31 g	2 „	64 „ : —
III. 47 g, 29 g, 8,5 g	5 „	100 „ : † innerh. 46 St.; 170 „ : † 293 Min. ; 590 „ : † 99 Min.
IV. 57 g, 33 g, 19 g	10 „	180 „ : † 227 Min. ; 330 „ : † 125 „ ; 530 „ : † 93 „
Eosinnatrium		
I. 39 g, 19 g, 9 g	1 „	26 „ : — ; 53 „ : — ; 110 „ : † 262 „
II. 49 g, 34 g, 10 g	5 „	102 „ : † innerh. 18 St.; 144 „ : innerh. 18 St.; 500 „ : † 66 „
III. 65 g, 30 g, 18 g	10 „	154 „ : † „ 18 „ ; 333 „ : † 105 Min. ; 555 „ : † 55 „

Die tödliche Dosis Eosin betrug in diesen Versuchen für 100 g Froschgewicht berechnet etwa 100 mg. Geringere Mengen riefen keine Vergiftungserscheinungen hervor. Das Eosin kann hiernach nicht als ein stark giftiger Stoff für Frösche angesehen werden.

Über die Übertragung von Krankheiten durch einheimische stechende Insekten.

II. Teil.

Von

Prof. **Dr. A. Schuberg,**
Regierungsrat
im Kaiserl. Gesundheitsamte

und

Dr. Ph. Kuhn,
Oberstabsarzt der Schutztruppe und Medizinalreferent beim Gouvernement Kamerun, früher beurlaubt zum Kaiserl. Gesundheitsamte.

Inhalt[1]): 2. Die Übertragung von Spirochaeten durch *Stomoxys calcitrans* einige Zeit nach dem Stich am kranken Tier (Zeitversuche). — 3. Die Übertragung von südwestafrikanischer Pferdesterbe durch *Stomoxys calcitrans*. — 4. Die Übertragung von Hühnerpocken durch *Stomoxys calcitrans*. — 5. Die Übertragung von Milzbrand durch *Stomoxys calcitrans*.

2. Die Übertragung von Spirochaeten durch *Stomoxys calcitrans* einige Zeit nach dem Stich am kranken Tier (Zeitversuche).

Unsere früheren, im I. Teil dieser Arbeit veröffentlichten Versuche hatten gezeigt, daß russische Rekurrens von Ratte auf Maus und von Maus auf Maus durch *Stomoxys* übertragen werden kann, wenn die Fliegen auf dem neuen Versuchstier sofort weiter saugen können, wenn also keine nennenswerte Unterbrechung im Saugakt eingetreten ist. Wir hatten auch nachgewiesen, daß bei dieser Art des Versuchs die Übertragung der Spirochaeten sogar durch einen einzigen Fliegenstich erfolgen kann. Dagegen waren zwei Versuche, bei denen die Fliegen erst 5 Minuten nach dem Saugen am infizierten Tier an ein gesundes Versuchstier angesetzt wurden, negativ.

Andererseits war es in zwei Fällen gelungen, das eine Mal 20, das andere Mal 30 Minuten nach dem Saugen am kranken Tier dadurch, daß die Fliegen auf der Haut eines gesunden Tieres zerquetscht wurden, eine Infektion zu erzielen.

Diese Versuche zeigten zwar, daß die Spirochaeten in den Fliegen mindestens bis zu 30 Minuten am Leben bleiben — sie sind in den Fliegen sogar noch länger lebend nachzuweisen — und daß sie dann auf perkutanem Wege noch infizieren können, sie gaben aber keinen Aufschluß darüber, ob auf natürlichem Wege, d. h. durch erneute Nahrungsaufnahme der Fliegen nach Verlauf der gleichen Zeit eine

---

[1]) Die im I. Teil (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. XXXI, Heft 2, 1911) unter 1. veröffentlichten Versuche bezogen sich auf die „Übertragung von Trypanosomen und Spirochaeten durch *Stomoxys calcitrans*".

Weiterverbreitung der Spirochaeten erfolgen kann. Für die Frage nach der praktischen Bedeutung der Infektion durch Fliegenstiche ist die Entscheidung hierüber aber von erheblicher Bedeutung. Denn je länger die Zeit ist, bis zu welcher die Fliegen befähigt bleiben, die Krankheitserreger durch ihre normale Lebenstätigkeit weiterzuverbreiten, desto größer ist natürlich auch die Wahrscheinlichkeit, daß dies unter natürlichen Verhältnissen tatsächlich geschieht. Es erschien uns daher geboten, uns mit den beiden früheren, oben erwähnten negativen Versuchen nicht zu bescheiden, sondern weitere Versuche anzustellen. Dies geschah in der im I. Teil unserer Arbeit genauer geschilderten Weise, sodaß es genügen dürfte, hierauf zu verweisen (S. 381).

Überimpfling	Nr. des Impfl.	Impfling	Zahl der Fliegen	Zahl der Stiche	Zeit	Tag des Versuchs	Verlauf	Bemerkungen
Ratte	83	Ratte	12	10	nach 5 Minut.	22. 11. 10	30. 11. Spirochaet. Schwache Infekt.	16. 12. nachgeimpft mit Spir. Oberm.; es erfolgte keine Infekt.
„	84	„	12	11	„	22. 11. 10	29. 11. Spirochaet. Schwache Infekt.	desgl.
„	85	„	15	14	„	22. 11. 10	6. 12. Spirochaet. Sehr schwache Infektion	desgl.
„	86	„	13	18	„	22. 11. 10	—	16. 12. nachgeimpft 17. 12. stark infiziert
„	87	„	18	21	„	22. 11. 10	28. 11. Spirochaet. Mittlere Infektion	16. 12. nachgeimpft mit Spir. Oberm.; es erfolgte keine Infekt.
„	89	„	19	19	nach 10 Minut.	14. 12. 10	—	—
„	90	„	17	17	„	14. 12. 10	—	—
„	91	„	16	16	„	14. 12. 10	21. 12. Spirochaet. Mittlere Infektion	—
„	92	„	25	25	„	14. 12. 10	desgl.	—
„	93	„	30	30	„	14. 12. 10	—	—
„	94	„	24	24	nach 15 Minut.	15. 12. 10	—	—
„	95	„	22	22	„	15. 12. 10	—	—
„	96	„	20	20	„	15. 12. 10	—	—
„	97	„	22	22	„	15. 12. 10	—	—
„	98	„	20	20	„	15. 12. 10	21. 12. Spirochaet. Schwache Infekt.	—
„	99	„	18	18	nach 30 Minut.	17. 1. 11	—	7. 2. nachgeimpft mit Spir. Oberm.; 10. 2. stark infiziert
„	100	„	18	18	„	17. 1. 11	—	desgl.
„	101	„	18	18	„	17. 1. 11	—	desgl.
„	102	„	18	18	„	17. 1. 11	—	desgl.
„	103	„	18	18	„	17. 1. 11	—	desgl.
„	104	„	18	18	„	18. 1. 11	—	desgl.
„	105	„	18	18	„	18. 1. 11	—	desgl.
„	106	„	18	18	„	18. 1. 11	—	desgl.
„	107	„	18	18	„	18. 1. 11	—	desgl.
„	108	„	18	18	„	18. 1. 11	—	desgl.

Von 5 Ratten, die 5 Minuten nach dem Saugen an kranken Ratten gestochen wurden, erkrankten 4, von 5 Ratten, die 10 Minuten nach den kranken gestochen wurden, erkrankten 2, von 5 Ratten, die 15 Minuten später gestochen wurden, erkrankte eine Ratte; 10 Versuche mit 30 Minuten Zwischenraum waren negativ.

Die 5 Ratten, die nach 5 Minuten gestochen waren, wurden mit Rekurrens-Spirochaeten intraperitoneal nachgespritzt; nur diejenige, die durch die Stiche nicht infiziert worden war, zeigte hiernach eine Infektion.

Die 10 Ratten, bei denen der Zwischenraum zwischen den Stichen am kranken und am gesunden Tier 30 Minuten gedauert hatte, wurden ebenfalls intraperitoneal mit *Spirochaeta obermeieri* nachgeimpft; bei jedem dieser Tiere trat eine starke Infektion auf.

Bei den übrigen Tieren wurde aus äußeren Gründen eine Nachprüfung nicht vorgenommen.

Die Versuche zeigen also, daß nach einer Unterbrechung von 5 Minuten fast alle Fliegen durch den Stich neu infizieren können, daß die Befähigung hierzu nach 10 Minuten und in noch erheblicherem Maße nach 15 Minuten abgenommen hat und nach 30 Minuten (10 Versuche) verschwunden zu sein scheint.

Wie bei den früheren Versuchen ist uns auch bei diesen Zeitversuchen aufgefallen, daß die Infektionen nach den Fliegenstichen sehr milde verliefen. Ausdrücklich muß jedoch bemerkt werden, daß der verwandte Spirochaetenstamm zur Zeit der Versuche nicht sehr virulent war und auch bei intraperitonealer Impfung in der Regel die Ratten nicht tötete. Es ist daher möglich, daß größere Virulenz des Stammes vielleicht etwas andere Ergebnisse zur Folge haben könnte.

Nattan-Larrier (1911) hat vor kurzem geprüft, wie lange Rekurrens-Spirochaeten im Darme gewöhnlicher Stubenfliegen am Leben bleiben können und ob sie danach noch pathogen sind. Die Fliegen wurden mit Blut infizierter Tiere gefüttert, nach verschiedenen Zeiträumen mit Kochsalzlösung zerrieben und die so erhaltene Emulsion Mäusen eingespritzt. Nach 1, 7, 25 und 26 Stunden konnte auf diese Weise eine allerdings meist sehr schwache Infektion erzielt werden; nach 48 Stunden trat eine Infektion nicht mehr ein. Nattan-Larrier betont selbst, daß die von ihm beobachteten Tatsachen von mehr nebensächlicher Bedeutung seien; denn man begreife schwer, wie eine nicht stechende Fliege das Virus verimpfen könne. Das ist vollständig zuzugeben; überdies vermag die Stubenfliege nur extravasales Blut aufzunehmen, wodurch die Möglichkeit, eine auch nur gelegentliche Übertragung herbeizuführen, weiter eingeschränkt wird.

Vor Nattan-Larrier haben übrigens schon Edm. Sergent und Foley festgestellt, daß eine Fliege *(Musca domestica)*, die von einem Kranken durch die Nase abgegangenes Blut aufgenommen hatte, zahlreiche bewegliche Spirochaeten enthielt. Sie ließen daher auch im Versuche Fliegen an Blut saugen, das ein Kranker durch Nasenbluten entleert hatte und das reich an Spirochaeten war, und konnten nachweisen, daß die Spirochaeten noch nach 24 Stunden unversehrt, aber nicht be-

weglich waren. Der Versuch einer Verimpfung durch Stubenfliegen von Menschen auf Affen ergab keine Infektion.

Von den verschiedenen Ansichten, die über die Übertragung der Rekurrens (russische, indische und algerische) durch Insekten geäußert worden sind, darf die, daß bei der Übertragung die Kleiderläuse *(Pediculus vestimenti)* eine Rolle spielen, zurzeit nicht nur als die herrschende, sondern auch durch experimentelle und epidemiologische Beobachtungen am besten begründete gelten. Es darf hierfür wohl auf die Arbeiten von Mackie (1907), Sergent und Foley (1907, 1910), Manteufel (1908), Graham-Smith (1909, 1910) und Fehrmann (1910) verwiesen werden[1]). Allerdings kann die Frage als noch nicht endgültig und nach jeder Richtung hin vollständig geklärt betrachtet werden. Auch Sergent und Foley bemerken am Schlusse ihrer Arbeit (1910) ausdrücklich: „Seuls les Poux nous ont donné des résultats, mais dans des conditions particulières, et rarement, eu égard au nombre des expériences. Si ces résultats font penser que de Poux jouent une rôle dans la propagation de l'infection, il reste toutefois encore des inconnues à découvrir".

Es erhebt sich nun die Frage, ob unsere Versuche geeignet sind, weitere Aufklärungen zu bringen, d. h. ob die Übertragung durch Stechfliegen *(Stomoxys)* bei der Ausbreitung des Rückfallfiebers tatsächlich in Betracht kommen kann.

Unsere früheren Versuche, bei denen es nur gelungen war, bei sofortigem Weitersaugen der Fliegen an einem neuen Versuchstier eine Infektion hervorzurufen, haben gezeigt, daß eine derartige Übertragung zwar eine Ausnahme sein möge, jedenfalls aber doch vorkommen und in manchen Fällen von Bedeutung werden könne. Sie schienen uns zu zeigen, daß immerhin bei uns mit der Möglichkeit der Übertragung von Spirochaeten durch die einheimische Stechfliege gerechnet werden müsse. (1911, S. 391, 392.)

Die neuen Versuche beweisen nun, daß die Infektion auch noch dann erfolgen kann, wenn nach dem ersten Saugen bis zu 15 Minuten vergangen sind. Dadurch wird die Möglichkeit der Verbreitung eine ganz erheblich größere. Denn in dieser Zeit ist, wenn wir uns so ausdrücken dürfen, der „Aktionsradius" der Fliegen ganz erheblich gewachsen. Eine Fliege, die an einem Kranken gesogen hat und von dort, ohne gesättigt zu sein, verscheucht worden ist, kann im Laufe einer Viertelstunde zahlreiche andere Individuen erreichen und zwar nicht nur innerhalb des gleichen Raumes oder Hauses, sondern auch im nächsten Hause oder an einer noch weiter entfernten Stelle.

Copeman, Howlett und Merriman haben vor kurzem (1911) durch einwandfreie Versuche nachgewiesen, daß mit Farbe gezeichnete Fliegen sich 1700 Yards, also über 1,5 Kilometer weit von ihrer Brutstätte entfernen können. Von besonderem Interesse ist ferner die Feststellung, daß einige dieser Fliegen in einer halben Stunde etwa 450 m[2]) durchflogen hatten; zwei andere Fliegen wurden 35, und eine dritte

[1]) Zusammenstellungen der verschiedenen Ansichten findet man u. a. bei Manteufel (1909) und Sergent und Foley (1910).

[2]) Nach der beigegebenen Kartenskizze berechnet; die Verf. geben für diesen Fall keine genauen Zahlen an. Ausdrücklich bemerkt ist: „the day being fine and sunny, with a gentle north-west breeze". Die Windrichtung war der Richtung des Fluges ungefähr gleichgerichtet.

45 Minuten, nachdem sie freigelassen worden waren, 800 Yards (731 m) von dieser Stelle entfernt angetroffen. Eine Fliege ist also imstande, in 1/4 Stunde ungefähr 1/4 Kilometer zurückzulegen. Die meisten Fliegen, mit denen die Versuche im allgemeinen angestellt wurden, waren *Musca domestica*, doch war auch *Stomoxys calcitrans* darunter. Auf welche Arten die eben erwähnten Einzelangaben sich beziehen, wird allerdings leider nicht berichtet, doch darf wohl angenommen werden, daß *Stomoxys calcitrans* und *Musca domestica* sich in dieser Hinsicht nicht wesentlich verschieden verhalten werden.

Für die vorliegende Frage lehren die interessanten Versuche der englischen Forscher aber jedenfalls, daß eine Verschleppung infektionsfähiger Spirochaeten durch *Stomoxys calcitrans* in einem Umkreis von etwa 1/4 Kilometer als möglich bezeichnet werden muß. Mit dieser Möglichkeit muß umsomehr gerechnet werden, als die genannte Stechfliege, wie allgemein bekannt, unter natürlichen Verhältnissen auch den Menschen oft befällt.

Hierfür kommen natürlich nur solche Örtlichkeiten in Betracht, an denen Stechfliegen häufig sind. Dies ist vorzugsweise in ländlichen Orten der Fall, aber auch in Städten, in denen viele größere Tiere zu landwirtschaftlichen oder Transportzwecken gehalten werden. Je weniger Sorgfalt auf die reinliche Unterbringung der Tiere, Entfernung des Mistes usw. verwendet wird, desto günstiger sind die Bedingungen für die Entwicklung der oft in großer Menge vorhandenen Stechfliegen, und je weniger die Stallungen der Tiere von den menschlichen Wohnräumen getrennt sind, desto größer ist die Möglichkeit, daß die Stechfliegen auch den Menschen befallen. Derartige Bedingungen treffen sicherlich für viele südliche und östliche Gegenden Europas, in denen das Rückfallfieber vorkommt, zu.

Eine Entscheidung darüber, ob nun tatsächlich neben den Kleiderläusen auch die Stechfliegen bei der Verbreitung der Rekurrens in Betracht kommen, vermögen wir selbst nicht zu fällen. Um sie zu treffen, sind epidemiologische Untersuchungen an Ort und Stelle notwendig, sowie der Nachweis, ob und wie lange in der Umgebung von Kranken gefangene Stechfliegen infektionsfähige Spirochaeten beherbergen[1]). Eine volle Entscheidung könnte natürlich nur durch das Gelingen direkter Übertragungsversuche mit solchen Fliegen von Mensch zu Mensch herbeigeführt werden.

3. Die Übertragung von südwestafrikanischer Pferdesterbe.

Die Pferdesterbe gehört bekanntlich zu denjenigen Krankheiten, die man früher als miasmatische bezeichnete, bei denen eine unmittelbare Ansteckung von Individuum zu Individuum nicht vorkommt, sondern das krankmachende Etwas an bestimmte Örtlichkeiten und Jahreszeiten gebunden ist. Ebenso wie es bei der Malaria erwiesen ist, nimmt man bei der Pferdesterbe an, daß Zwischenträger die Ansteckung vermitteln; der größte Teil der Forscher weist diese Rolle den Mücken, einige auch den

[1]) Hierbei wird allerdings zu berücksichtigen sein, daß die Übertragung der Spirochaeten unmittelbar vom Menschen auf kleine Versuchstiere oft Schwierigkeiten begegnen wird; vergl. hierzu Uhlenhuth und Händel (1907, S. 3).

Zecken zu. Fliegen sind bisher in der Literatur nicht beschuldigt, und Versuche mit ihnen nicht angestellt worden.

Die unmittelbare Veranlassung zu unseren Versuchen gab der Umstand, daß zwei Pferde an Pferdesterbe erkrankt waren, bei denen die Ansteckungsart dunkel erschien. Beide hatten mit zu anderen Untersuchungen dienenden pferdesterbekranken Tieren in einem Stall gestanden; ein Pferd (Nr. 3) war am 2. 11. 09 mit konserviertem Pferdesterbeblut (A) aus Windhuk geimpft worden. Das Tier erkrankte am 15. 12. 09 und verendete am 19. 12. 09 an typischer Pferdesterbe; bei dem beträchtlichen Zeitraum, der zwischen Impfung und Krankheitsbeginn lag, wurde angenommen, daß das betreffende Windhuker Virus unwirksam geblieben war. Das zweite Pferd (Nr. 2) war niemals geimpft worden, es erkrankte am 30. 11. 09 und verendete am 4. 12. 09 an typischer Pferdesterbe. Da der Stall ab und zu einige Exemplare von *Stomoxys* aufgewiesen hatte, so fiel der Verdacht der Übertragung der Krankheit auf diese[1]).

Am 1. März 1910 wurden mehrere Gläser mit Fliegen auf die Haut eines schwer sterbekranken Pferdes gesetzt, das einige Tage vorher mit Insektenpulver bestreut worden war. Die Wirkung des Pulvers war wider Erwarten noch so stark, daß die Fliegen zwar zum Stechen ansetzten, sämtlich aber bald nachließen und zurücktaumelten. Darauf wurde das Pferd gewaschen und der Versuch am nächsten Tage wiederholt. Nunmehr gelang es einer Anzahl Fliegen ,zu stechen, während andere versagten und zurückfielen; diejenigen Fliegen, die gestochen hatten, wurden unmittelbar danach auf ein gesundes Pferd gesetzt. Es wurden im ganzen 30 Stiche bei dem gesunden Pferde gezählt.

Als letzteres am 23. März 1910 noch keine Infektion zeigte, wurden ihm wieder Fliegen angesetzt, die unmittelbar vorher an einem nicht mit Insektenpulver bestreuten kranken Pferde gestochen hatten. Es wurden 30—40 Stiche beobachtet. Nach 21 Tagen, am 13. 4. trat bei dem Pferde Fieber auf, am 16. 4. verendete es an typischer Pferdesterbe.

Bei der großen Sorgfalt, mit der für diesen Versuch jede Möglichkeit einer anderweitigen Übertragung der Krankheit auf das von den Fliegen gestochene Tier ausgeschaltet wurde, erachten wir den Beweis für erbracht, daß *Stomoxys calcitrans* die Pferdesterbe beim unterbrochenen Stechen von einem kranken auf ein gesundes Pferd übertragen kann. Nach einer neueren Erfahrung des einen von uns (Ph. Kuhn), über die auf der Tagung der freien Vereinigung für Mikrobiologie zu Dresden 1911 kurz berichtet worden ist, kann die Inkubationszeit der Pferdesterbe bis zu 45 Tagen betragen; es ist infolgedessen nicht zu sagen, ob die Infektion durch die erste Gruppe von Fliegen, die am 1. März 1910, oder die zweite, die am 23. März 1910 stachen, vermittelt worden ist. Für die erste Gruppe wäre die Inkubationszeit 44 Tage, läge also noch innerhalb der bisher ermittelten Breite.

Wir haben aus unserem Versuch lediglich den Schluß gezogen, daß Stallinfektionen möglich sind; für die Annahme, daß die *Stomoxys* eine Rolle

[1]) Mit Rücksicht auf das Ergebnis der nachfolgenden Versuche wurde dann noch mehr wie vorher darauf geachtet, daß der mit pferdesterbekranken Tieren besetzte Stall fliegenfrei war. Die Fenster wurden mit Drahtgaze verschlossen und die Pferde, sowie alle sichtbar werdenden Fliegen mit Insektenpulver bestäubt.

bei der Übertragung der Seuche in der Natur spielt, haben wir uns nicht entscheiden können. Ph. Kuhn hat dieser unserer Auffassung bei der ersten Mitteilung über den Versuch auf der Tagung der Freien Vereinigung für Mikrobiologie (1910) Ausdruck gegeben und sie neuerdings in der Diskussion zu dem Vortrage von Reinecke auf dem Kolonial-Kongreß 1910 und in einer Erwiderung gegen Rickmann (1911) wiederum betont.

Wenn wir nach dem Ausfall dieses Versuches geneigt sind, die beiden erwähnten unaufgeklärten Stallinfektionen der *Stomoxys* zur Last zu legen, so müssen wir heute doch betonen, daß vielleicht in dem einen Falle auch noch andere Erklärungen möglich sind. In diesem wenigstens (Pferd 3) kann die Ansteckung doch auf das Windhuker Virus zurückgehen; denn die Inkubationszeit liegt noch in der neuerdings festgestellten Inkubationsbreite (s. o.), bei dem anderen Fall (Pferd 2) liegt diese Möglichkeit allerdings nicht vor.

4. Die Übertragung von Hühnerpocken durch *Stomoxys calcitrans*.

Zu den Versuchen, Hühnerpocken durch den Stich von *Stomoxys calcitrans* zu übertragen, verwendeten wir das gleiche Virus, das zu den Untersuchungen von Schuberg und Schubotz (1910) über den mikroskopischen Befund bei dieser Erkrankung diente.

Versuch 1 (Huhn 670). Als Ausgangsmaterial diente ein Huhn (662), das am 17. 2. 10 durch Strichimpfung auf den Kamm mit Glyzerinmaterial infiziert worden war. An die Pocken, die schon am 19. 2 zuerst sichtbar waren, wurden am 25. 2. acht Fliegen angesetzt und nach kurzem Saugen sofort an die rechte Kammseite eines gesunden Huhnes (670) übertragen[1]). Sechs Stellen, an denen die Fliegen gesogen hatten, waren durch ganz kleine Bluttröpfchen deutlich erkennbar; sie wurden in einer Skizze des Kopfes eingezeichnet. Am 2. 3., also nach 5 Tagen, war an 5 dieser aufgezeichneten Stellen der Beginn der Pockenbildung deutlich wahrzunehmen. Am 3. 3. erschien an der letzten der notierten Stellen eine Pocke; die anderen hatten sich vergrößert. Am 5. 3. tritt außer den sechs bezeichneten Pocken eine neue auf; vermutlich war die Stichstelle übersehen worden. Am 7. 3. sind alle Pocken, die regelmäßig rund erscheinen, sehr deutlich geworden. Auch am 14. 3. sind die meisten noch ziemlich rund. Nur eine als Nr. 4 bezeichnete Pocke maß 4 × 7 mm; dagegen hatte Nr. 5 4 × 4 mm, Nr. 6 5,5 × 5,5 mm. Am 17. 3. waren sie noch etwas weiter gewachsen: Nr. 4 6 × 8 mm, Nr. 5 6 × 6 mm. Um eine Pocke (Nr. 1) entstehen einige weitere sekundäre Pusteln. Die Vergrößerung der durch den Stich entstandenen Pocken ging noch weiter fort, so daß am 26. 3. Nr. 4 6 × 9,5, Nr. 5 6 × 8 und Nr. 6 6,5 × 9,5 mm maßen, sie waren also auch etwas unregelmäßig geworden. Außerdem waren nun

[1]) Ausdrücklich bemerkt wird, daß, wie bei allen unseren Versuchen, beim Weitersaugen auf einem neuen Tier die andere, mit Gaze überspannte Öffnung des Versuchsglases, die also mit dem kranken Tier nicht in Berührung gekommen war, benützt wurde; vergl. den I. Teil unserer Arbeit (1911, S. 381).

auch an anderen Stellen, so am rechten Auge und rechts am Schnabel sekundäre Pusteln entstanden. Am 30. 3. begannen die Pocken allmählich abzutrocknen.

Versuch 2 (Huhn 671). Als Ausgangsmaterial wurde das gleiche Huhn (662) wie bei Versuch 1 benützt und am 25. 2. 10 25 Stiche von etwa ebenso vielen Fliegen an der rechten Seite des Kammes von Huhn 671 angebracht. Am 2. 3. gehen die meisten Pocken an; am 3. 3. konnten 18 Pusteln gezählt werden. Der Verlauf, das Wachstum der einzelnen Pusteln usw. sind im wesentlichen wie bei Versuch 1, nur verläuft die Infektion etwas rascher. Schon am 14. 3. fangen die Pocken an etwas zurückzugehen und neue treten nicht auf. Am 30. 3. ist nur noch eine Pocke am Abfallen, alle anderen sind abgefallen und in Heilung begriffen.

Versuch 3 (Huhn 701). In diesem Versuche wurde als Ausgangsmaterial ein Huhn benützt, bei welchem die Pocken schon einige Tage vorher abgefallen waren. Die Fliegen wurden am 5. 10. 10. nach längerem Saugen an diesem Tier auf die rechte Kammseite des gesunden Huhns übertragen. Sieben Stichstellen wurden bezeichnet; zwei von ihnen wurden, bevor äußere Erscheinungen sichtbar waren, am 6. und 8. 10. zum Zwecke mikroskopischer Untersuchung exzidiert. Am 14. 10. waren an 4 Stellen Pusteln sichtbar, an einer nichts. An der einen Zacke des Kammes, welche am 6. 10. teilweise abgeschnitten worden war, wird der ganze Schnittrand pockenkrank. Der Verlauf der einzelnen Pocken wurde nicht weiter verfolgt, da diese zum Zwecke der mikroskopischen Untersuchung konserviert wurden.

Alle drei Versuche, Hühnerpocken durch unterbrochenen Stich von *Stomoxys* zu übertragen, hatten ein positives Ergebnis, und zwar ging die größte Mehrzahl der Stiche an, in einem Versuche (Nr. 1), in welchem die einzelnen Stiche aufgezeichnet wurden, sogar alle, in einem zweiten (Nr. 3) von fünf, die weiter verfolgt werden konnten (s. oben), vier, während am Schnittrande einer exzidierten Stelle ebenfalls Pockenbildung auftrat. Die Übertragung bei sofortigem Weitersaugen der Fliegen gelingt also ganz außerordentlich leicht und sogar dann, wenn bei dem als Ausgangsmaterial benützten Huhn die Pocken schon abgefallen sind (Versuch 3).

Es wäre daher von großem Interesse, zu untersuchen, wie die Übertragung gelingt, wenn zwischen den Stichen am gesunden und kranken Huhn einige Zeit verstrichen ist. Bedauerlicherweise können wir über die in dieser Richtung unternommenen Versuche nicht berichten, da die hierzu verwendeten Hühner einzelne Erscheinungen spontaner Pockenerkrankung zeigten, also nicht als einwandsfrei angesehen werden können. Das gleiche gilt von Versuchen, bei welchen die Fliegen an gesunde Hautstellen von am Kamme geimpften und nur dort Pocken besitzenden Hühnern angesetzt wurden. Leider ist es uns inzwischen nicht möglich gewesen, diese Versuche zu wiederholen.

Bei der großen Widerstandsfähigkeit des Virus der Hühnerpocken, insbesondere auch gegen Eintrocknen, und bei der Kleinheit der Mengen, mit denen eine Ansteckung zu erzielen ist, halten wir es indessen für nicht unwahrscheinlich, daß auch bei längerer Unterbrechung des Stechens eine Infektion möglich ist. Wir glauben daher auch, daß die Übertragung der Hühnerpocken durch Stechfliegen praktisch in Frage kommen kann. Wenn auch die Übertragung innerhalb des gleichen Stalles

oder im gleichen Gehöft in der Regel durch direkte Berührung mit kranken Tieren erfolgen wird, so muß wohl doch damit gerechnet werden, daß die Krankheit durch Stechfliegen auf andere Gehöfte verschleppt werden kann. Da die Larven der Stechfliegen sich im Mist entwickeln, in dem die Hühner bekanntlich, um ihrer Nahrung nachzugehen, gerne scharren, so ist die Möglichkeit, daß die Hühner von Fliegen gestochen werden, leicht gegeben. Daß die Hühner aber zu den Tieren gehören, an welchen *Stomoxys calcitrans* saugt, wird z. B. auch von Roubaud (1911, S. 127) angegeben.

5. Die Übertragung von Milzbrand durch *Stomoxys calcitrans*.

Die Ansicht, daß Milzbrand durch Insektenstiche übertragen werden kann, ist vielfach verbreitet und in der Literatur nicht selten ausgesprochen worden. Dagegen wurde, soviel wir wissen, bis jetzt nur einmal über eine wirkliche experimentelle Übertragung berichtet und zwar mit sog. Schafzecken oder Schaflausfliegen *(Melophagus ovinus)*, ungeflügelten, als läuseartige Ectoparasiten lebenden Fliegen. Über erfolgreich ausgeführte Versuche aber mit wirklichen, d. h. geflügelten und sich daher leicht über einen größeren Bezirk verbreitenden „Fliegen", wie z. B. *Stomoxys calcitrans*, haben wir Angaben in der Literatur nicht auffinden können. Es ist wohl nicht zu leugnen, daß die experimentelle Prüfung dieser Frage von großem wissenschaftlichem und praktischem Interesse ist.

Wie erwähnt, ist die Ansicht, daß Insektenstiche für die Milzbrandverbreitung in Betracht kommen, schon oft ausgesprochen worden. Sie findet sich auch in Lehrbüchern[1]) angegeben; und so kommt es wohl, daß sie gelegentlich wie eine allgemein bekannte Tatsache angeführt wird, obwohl die Spezialliteratur wirkliche experimentelle Beweise vermissen läßt.

Nuttall, welcher der Frage nach der Bedeutung der Insekten, Arachniden und Myriopoden als Krankheitsüberträger schon seit langer Zeit eingehende Aufmerksamkeit geschenkt hat, hat in seiner 1899 erschienenen ausführlichen Zusammenstellung über diesen Gegenstand auch die die Milzbrandübertragung betreffende Literatur bis 1899 zusammengestellt und kritisch besprochen. Aus dieser außerordentlich wertvollen und sorgfältigen Zusammenstellung, auf die wir für die ältere Literatur verweisen und die wir angelegentlichst zur Lektüre empfehlen, geht hervor, daß für die Möglichkeit der Übertragung des Milzbrandes durch Stiche von Fliegen, insbesondere auch von *Stomoxys calcitrans*, zahlreiche und namhafte Forscher eingetreten sind, von denen hier nur R. Virchow, Davaine, Mégnin, Bollinger, R. Koch, R. Blanchard, Flügge und Celli erwähnt seien. Aber so zahlreiche und alte Angaben vorliegen — die ältesten reichen bis ins 18. Jahrhundert zurück — so wenig ist die Sache wirklich geklärt. „Es ist auffallend — sagt Nuttall mit Recht —, wie wenig einwandfreie Beobachtungen über die Rolle, welche besonders die stechenden, blutsaugenden Fliegen bei der Verbreitung des Milzbrandes spielen, vorliegen, während doch von

[1]) Z. B. Kolle-Hetsch, 3. Aufl. (1911), S. 213; Sobernheim in Kolle-Wassermann, 1. Aufl. (2. Band, S. 61); Friedberger und Fröhner (6. Aufl., 1904, S. 507); Hutyra und Marek (2. Aufl., 1910, S. 10) u. a. m.

vielen Autoren darauf hingewiesen wird. Die ersten Empfindungen, der plötzlich auftretende stichartige Schmerz, sowie die Lokalerscheinungen riefen in vielen Fällen zweifellos die falsche Annahme wach, daß die Erkrankung durch den Stich eines Insekts entstanden sei."

Es ist zuzugeben, daß manche Angaben in diesem Sinne zu beurteilen sein mögen, und daß die Zurückführung einzelner Fälle von Milzbranderkrankungen auf Fliegenstiche in der Regel nicht leicht in dem Maße auf ihre Berechtigung geprüft werden kann, daß diese Art der Übertragung hieraus tatsächlich als bewiesen angesehen werden könnte. Von besonderem Interesse sind solche Fälle, von denen auch Nuttall aus der älteren Literatur einige anführt, bei denen die Infektion Personen betraf, welche mit milzbrandkranken Tieren oder den Kadavern von solchen bestimmt nicht in Berührung gekommen waren; aber auch aus solchen Fällen hat sich bisher noch niemals ein einwandfreier Beweis herleiten lassen. Immerhin werden die stechenden Insekten auch noch in neueren Arbeiten so häufig der Übertragung beschuldigt, daß die fortgesetzte Erörterung dieser Frage wohl begründet erscheint. So glaubt Hewitt (1910) zwar, daß die Stubenfliege *(Musca domestica)* wichtiger sei, ist aber doch der Meinung, daß *Stomoxys calcitrans* den Milzbrand übertragen könne.

Profé (1906) nimmt in einem im Auftrage des Vereins beamteter Tierärzte Preußens erstatteten Referat folgende Stellung ein: „Fälle, in denen die Übertragung durch Personen, infizierte Gegenstände oder durch Insekten stattfindet, sind zwar relativ selten, dürfen indessen nicht ganz unberücksichtigt bleiben. Für die Übertragung des Anthrax auf den Menschen scheinen die Insekten eine nicht unerhebliche Rolle zu spielen." Er erwähnt dann die von Pilf (1904) berichteten Fälle.

Letzterer Autor berichtete über zwei Erkrankungen von Menschen an Milzbrand in Preußen, bei denen er eine Ansteckung durch Fliegenstiche als sicher annahm.

Auch aus den letzten Jahren wurde wiederholt über solche Fälle berichtet. So wird in den „Veröffentlichungen aus den Jahres-Veterinärberichten der beamteten Tierärzte Preußens" für das Jahr 1901 (I. Teil, S. 13) ein Fall von Milzbrand bei einem Pferde erwähnt, das nach Ansicht des berichtenden Kreistierarztes durch eine Fliege infiziert worden sei (Bermbach 1901), und in dem Jahresbericht über die Verbreitung von Tierseuchen im Deutschen Reiche (1907, S. 13) wird angegeben, daß ein Fall von Milzbrand beim Menschen durch einen Fliegenstich erfolgt sei.

In den von Burkhardt bearbeiteten Ergebnissen der durch Bundesratsbeschluß vom 8. Juli 1909 eingerichteten Statistik der Milzbrandfälle unter Menschen für das Jahr 1910 wird berichtet: „Daß die Ansteckung durch Insektenstich übermittelt sei, wird nur in einem einzigen Falle behauptet; in 6 anderen Fällen war möglicherweise oder mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit die Übertragung der Erkrankung durch Insektenstich erfolgt" (S. 211). In diesem Falle handelte es sich um ein 24jähriges Mädchen, das im Gesicht an bakteriologisch festgestelltem Hautmilzbrand erkrankte. Eine direkte Berührung mit milzbrandkrankem Material hatte nach den vorliegenden Angaben nicht stattgefunden.

Daß angesichts der zahlreichen kasuistischen Mitteilungen über die Bedeutung der Stechfliegen für die Milzbrandübertragung die experimentelle Prüfung dieser

Frage schon lange als Bedürfnis empfunden und wiederholt versucht wurde, kann natürlich nicht wundernehmen. Über die älteren, in dieser Hinsicht unternommenen Versuche hat Nuttall (1909) ebenfalls ausführlich berichtet und sie kritisch besprochen. Beweisende Versuche mit *Stomoxys* oder anderen stechenden Insekten sind nicht unter ihnen, da niemals eine wirkliche Übertragung erfolgreich ausgeführt wurde. Auch Nuttall hält keinen bis dahin vorliegenden Versuch für beweisend und meint: „Jedenfalls erscheint es an der Zeit, die Frage, welche mehr als anderthalb Jahrhunderte ventiliert ist, auf experimentellem Wege zu lösen."

Nuttall selbst hat Versuche mit Wanzen angestellt (1898), die aber alle negativ verliefen. Auf Grund dieser Versuche kam er zu dem Schluß, „daß eine Infektion durch Wanzenstiche entweder gar nicht oder nur ausnahmsweise zustande kommt." Auch Versuche von Joly (1898) und von Mühling (1899) mit Wanzen blieben erfolglos, ebenso Versuche von Nuttall mit Flöhen und Tabaniden (*Haematopota pluvialis*).

In der oben erwähnten Literatur-Zusammenstellung erwähnte Nuttall gelegentlich, daß er Versuche mit Mücken und *Stomoxys*-Arten anzustellen beabsichtige; indessen scheint er solche entweder nicht oder wenigstens ohne Erfolg ausgeführt zu haben, da er auch in seinem auf dem Internationalen Hygiene-Kongreß in Berlin gehaltenen Vortrage über die Bedeutung der Insekten als Krankheitsüberträger (1907) hierauf nicht zurückkam.

Auf dem gleichen Kongreß berichtete Galli-Valerio „qu'on peut observer le développement du charbon par piqûre de Taons qui ont piqué auparavant des animaux." Ob sich jedoch Galli-Valerio hierbei auf spezielle experimentelle Erfahrungen stützt, oder auf die allgemein verbreiteten Literatur-Meinungen, ist nicht ersichtlich.

In der Diskussion zu dem Thema „Insekten als Verbreiter von Krankheiten", im Anschluß an die Referate von Galli-Valerio und Nuttall, sprach ferner Terni die Ansicht aus, daß „seulement les *Stomoxys* sont de vrais agents de transmission du charbon". Er schloß seine Ausführungen, die sich übrigens außerdem auf Immunitätsfragen erstreckten, mit dem Satze: „Nos observations présentent plus d'intérêt parce qu'elles sont recueillies sur le champ naturel de développement de la maladie et pas seulement limités aux expériences de laboratoire". Nach dieser Äußerung ist nicht klar, ob Terni eine experimentelle Prüfung der Frage versucht hat. Eine Mitteilung darüber haben wir jedenfalls in der Literatur nicht finden können.

Die ersten und, soviel uns bekannt, bis jetzt einzigen einwandfreien Übertragungsversuche hat, wie schon oben erwähnt, Bongert auf der 4. Tagung der Freien Vereinigung für Mikrobiologie in Berlin 1910 veröffentlicht, im Anschluß an einen Vortrag von Kuhn, in welchem über unsere im I. Teil dieser Arbeit veröffentlichten Versuche vorläufig berichtet wurde. Bongert teilte hier mit, daß er vor mehreren Jahren[1]) die Möglichkeit der Übertragung des Milzbrandes bei Schafen durch den Stich der Schaflausfliege (*Melophagus ovinus*) experimentell dartun konnte. „Von einem an Milzbrand gestorbenen Schafe entnahm er 4 Schaflausfliegen und

[1]) Ob Bongert diese Versuche auch anderweitig veröffentlicht hat, ist uns nicht bekannt geworden. In den in Baumgartens Jahresbericht verzeichneten Arbeiten Bongerts haben wir nichts darüber finden können.

setzte diese einem anderen gesunden Schafe hinter der Schulter an. Durch Zerquetschen einer solchen Fliege zwischen zwei Objektträgern und Färben konnte er vorher nachweisen, daß diese Blut gesaugt hatten und auch Milzbrandbazillen in ihrem Intestinum enthielten. Nach Verlauf von 3 Tagen nach dem Ansetzen der Hautparasiten starb das Schaf an Milzbrand. Aus der karbunkulösen Entzündung der Haut und Unterhaut hinter der Schulter, wo die Insekten angesetzt worden waren, war zu folgern, daß die Milzbrandinfektion von dieser Stelle durch den Biß der Schaflausfliegen ihren Ausgang genommen hatte." Bongert zieht hieraus den richtigen Schluß, daß man daher „bei enzootischem Auftreten von Milzbrand in einer Schafherde mit diesen weit verbreiteten Hautparasiten der Schafe als Seuchenüberträger zu rechnen habe."

Wir selbst hatten von Anfang unserer Arbeiten an Versuche, Milzbrand durch Stechfliegen zu übertragen, in Aussicht genommen. Da es sich bei der von Bongert nachgewiesenen Übertragung durch *Melophagus* infolge der ectoparasitischen Lebensweise des flügellosen Tieres nur um Übertragung innerhalb des gleichen Stalles oder der gleichen Herde, und zwar nur bei Schafen, handeln kann, so erschienen uns Versuche mit *Stomoxys*, die bisher noch von keiner Seite angestellt worden sind, abgesehen von dem Interesse, das der Nachweis weiterer Überträger bietet, um so weniger überflüssig geworden zu sein, als bei der Verbreitungsmöglichkeit der Stechfliegen unter Umständen mit einer Verschleppung der Krankheit über einen größeren Bezirk hin und von einer Tierart auf die andere, sowie von Tieren auf den Menschen gerechnet werden muß.

Schließlich muß ausdrücklich betont werden, daß unsere Versuche mit der Möglichkeit der Verschleppung von Milzbrandkeimen durch die nicht stechenden Stubenfliegen *(Musca domestica, Musca (Calliphora) vomitoria)* usw. nichts zu tun haben. Die Literatur über diese Frage kann daher hier unberücksichtigt bleiben[1]).

Die Technik auch dieser Versuche war im wesentlichen die gleiche wie bei unseren übrigen Versuchen, abgesehen von den selbstverständlichen, durch die Gefährlichkeit des Materials gebotenen besonderen Vorsichtsmaßregeln. Als Material zur Infektion dienten bei den meisten Versuchen die im Ganzen freigelegten oder einzeln herausgenommenen Bauchorgane von Mäusen und Meerschweinchen, die nach Impfung an Milzbrand verendet waren; insonderheit wurden Milz und Leber verwendet, bei denen die mikroskopische Untersuchung zahlreiche Milzbrandbazillen nachwies.

Die Fliegen wurden in der Regel an die frischen Organe angesetzt, die anfänglich noch warm waren, aber bei ihrer Kleinheit in einigen Minuten erkalteten. Es kam auch vor, daß die Tiere schon 12 Stunden verendet waren, und die Organe erst dann zum Versuch freigelegt werden konnten. Es schien, als ob die Fliegen an den noch warmen Organen besser saugten als an den erkalteten. Viel wichtiger für das Anlocken der Fliegen zum Saugen erwies sich im Laufe der Versuche eine Versuchsanordnung, bei der der Einfluß der menschlichen Hand auf die Fliegen nach dem Ansetzen der Gläser auf die Organe ausgeschaltet wurde. Solange die Gläser mit der

[1]) Vergl. hierzu Hewitt (1910), Galli-Valerio (1910) und Graham-Smith (1911).

Hand festgehalten wurden, sammelten sich die Fliegen gern an dem oberen Gazebezug des Glases; die menschliche Hand lockte sie mehr als der Kadaver. Dasselbe wurde auch noch bemerkt, als die Gläser mit einer kurzen eisernen Klemme aufgesetzt und an diesen vermittels der Hand festgehalten wurden. Erst als sie völlig frei aufgesetzt und mechanisch festgestellt wurden, war die untere Öffnung sofort das Ziel der meisten Fliegen im Glase.

Nur bei einer Versuchsreihe wurden die Fliegen an eine lebende, mit Milzbrand infizierte Maus angesetzt, und zwar geschah dies erst dann, als es gelungen war, die Bazillen in dem der Schwanzspitze entnommenen Blute in reichlicher Menge mikroskopisch nachzuweisen. Wie bekannt, erscheinen bei Milzbrand die Bazillen im Blute ziemlich plötzlich. Es dürfte aber doch wohl von Interesse sein, zu erwähnen, daß bei der zum Versuche verwendeten Maus, die ungefähr 24 Stunden vorher subkutan geimpft worden war, um 11 Uhr morgens im ganzen Präparat nur ein Stäbchenpaar gefunden wurde, um 2^{30} dagegen, also nach $3^1/_2$ Stunden, das Blut völlig mit Bazillen überschwemmt war. Das war $2^1/_2$ Stunden vor ihrem Tode.

Bei allen Versuchen wurde, wie schon oben (S. 215) erwähnt, beim Weitersaugen der Fliegen auf dem gesunden Tier stets die Öffnung des Versuchsglases, die mit dem kranken Tier nicht in Berührung gekommen war, benützt. Die Fliegen wurden bei den gesunden Tieren (Impflingen) am Bauche angesetzt.

Von den Versuchen, Milzbrandbazillen von einem infizierten Kadaver bei sofortigem Weitersaugen der Fliegen zu übertragen, verliefen ein Versuch mit 4—5 Fliegen und ebensovielen Stichen von Meerschweinchen auf Maus (Nr. 1) und ein Versuch mit 2 Fliegen von Meerschweinchen auf Meerschweinchen (Nr. 7) positiv. Im ersten Versuch war die Maus nach 5 Tagen an Milzbrand verendet und zeigte am Bauch typisches sulziges Ödem, in dem andern (Nr. 7) war das Meerschweinchen schon nach 2 Tagen unter den gleichen Erscheinungen gestorben.

In einem weiteren Versuch sog eine Fliege nach Infektion an einer stark infizierten Meerschweinchenmilz zunächst an einer Maus (Nr. 3), unmittelbar danach an einer zweiten und dritten (Nr. 4 und 5) und nach 10—15 Minuten an einer vierten Maus (Nr. 6). Vor dem Saugen an der zweiten und dritten Maus (Nr. 4 und 5) war die Fliege jedesmal wieder an die infizierte Milz angesetzt worden. An der letzten Maus sog sie, ohne inzwischen nochmals an die infizierte Milz angesetzt worden zu sein. Von diesen Mäusen erlag die erste (Nr. 3) der Infektion nach 2 Tagen unter den typischen Erscheinungen des Milzbrandes (sulziges Ödem an der Stichstelle). Die Maus, welche als zweite von der Fliege gestochen worden war (Nr. 4), machte vom 2. bis 5. Tage einen deutlich kranken Eindruck, die beiden weiteren (Nr. 5 und 6) blieben wie diese am Leben, jedoch ohne irgend welche Erscheinungen zu zeigen. Die drei überlebenden Tiere (Nr. 4, 5 und 6) wurden 15 Tage nach dem Stechversuch mit je $^1/_2$ Öse Milzbrandkultur nachgeimpft, um festzustellen, ob die Stiche der Fliegen einen immunisierenden Einfluß gehabt hatten, wofür die Erkrankung und Genesung der Maus Nr. 4 hätte sprechen können. Alle starben nach 2—3 Tagen an Milzbrand.

Überimpfling	Kadaverteil	Nr. des Impflings	Impfling	Zahl der Fliegen im Glase	Zahl der Fliegen, die stachen	
					am Kadaver	am Impfling
Meerschwein	Leber, stark infiziert	1	Maus	nicht aufgezeichnet	4—5	4—5
„	Milz, sehr stark infiziert	3	„	1	1	1
dasselbe	dieselbe	4	„	dieselbe		dieselbe
„	„	5	„	„		„
„	„	6	„	„		„
Meerschwein	Milz, mittelstark infiziert	7	„	8	2	2
„	Bauchorgane	8	Meerschw.	nicht aufgezeichnet	1	1
„	Bauchorgane, insbesondere Milz, stark infiziert	9	Maus	5—6	1	1
dasselbe	dieselben	10	„	dieselben	2	2
Maus	Bauchorgane, besonders Milz und Leber, mäß. infiziert	11	„	10	4—5	5—6
dieselbe	dieselben	12	„	9	2	1—2
„	„	13	„	7	2	5
„	„	14	„	7	1	5
„	„	15	„	6	3	5
„	„	16	„	6	2	1
„	„	17	„	—	—	dieselben wie bei 15
„	„	18	„	—	—	4 von den 7 Fliegen im Versuch 14 (2 tot)
„	„					1 von den 9 Fliegen im Versuch 12 (8 tot)
„	„					5 von den 10 Fliegen des Versuchs 11 (5 tot)

Zeit	Tag der Impfung 1911	Verlauf	Bemerkungen
sofort	29. 3.	Maus 1 tot am 3. 4. an Milzbrand. Am Bauch sulziges Ödem.	—
„	2. 5.	Maus 3 tot am 4. 5. an Milzbrand. Am Bauch sulziges Ödem.	—
„	2. 5.	Maus 4 ist vom 3. bis 6. 5. sichtbar krank.	Maus 4, 5 und 6 wurden am 17. 5. mit je ½ Öse Milzbrandkultur subkutan geimpft, 2 Tiere starben am 19. 5., ein Tier am 20. 5. an Milzbrand. Es ließ sich nicht genauer feststellen, welche zuletzt starb.
„	2. 5.	—	
nach 10—15 Minuten	2. 5.	—	
sofort	9. 5.	Maus 7 tot am 11. 5. an Milzbrand. Am Bauch sulziges Ödem.	—
„	11. 5.	Meerschweinchen 8 scheint einige Tage nach dem Stich krank.	Meerschweinchen 8 wurde am 17. 5. mit ½ Öse Milzbrandbazillenkultur subkutan nachgeimpft. Es starb am 19. 5. an Milzbrand.
nach 10 Minuten	19. 5.	Maus 9 tot am 23. 5. an Milzbrand. Am Bauch sulziges Ödem.	—
„	19. 5.	Maus 10 zeigt am 24. 5. eine starke Geschwulst am Bauch und wird getötet. Milzbrand. Sulziges Ödem unter der Bauchhaut.	—
nach 20 Minuten	12. 9.	—	Maus 11 wurde am 12. 10. mit ½ Öse Milzbrandkultur subkutan nachgeimpft. Tod am 13. 10. an Milzbrand.
nach 30 Minuten	12. 9.	—	Maus 12 wurde am 12. 10. mit ½ Öse Milzbrandkultur subkutan nachgeimpft. Tod am 13. 10. an Milzbrand.
nach 1 Stunde	12. 9.	—	Maus 13 wurde am 12. 10. mit ½ Öse Milzbrandkultur subkutan nachgeimpft. Tod am 17. 10. an Milzbrand.
nach 2 Stunden	12. 9.	—	Maus 14 wurde am 12. 10. mit ½ Öse Milzbrandkultur subkutan nachgeimpft. Tod am 13. 10. an Milzbrand.
nach 5¼ Stunden	12. 9.	Bei den Stechversuchen eingegangen.	—
nach 23 Stunden	13. 9.	—	Maus 16 wurde am 12. 10. mit ½ Öse Milzbrandkultur subkutan nachgeimpft. Tod am 13. 10. an Milzbrand.
nach 24 Stunden	13. 9.	—	Maus 17 stirbt am 28. 9. Die Sektion ergibt keinen Anhalt für Milzbrand.
„	13. 9.	—	
„	13. 9.	—	Maus 18 wurde am 12. 10. mit ½ Öse Milzbrandkultur subkutan nachgeimpft. Tod am 14. 10. an Milzbrand.
„	13. 9.	—	

Überimpfling	Kadaverteil	Nr. des Impflings	Impfling	Zahl der Fliegen im Glase	Zahl der Fliegen, die stachen	
					am Kadaver	am Impfling
Meerschwein	Leber, gut infiziert, in vitro	19	Maus	10	5	7
dasselbe	dieselbe	20	„	8	2	3
„	„	21	„	8	2	6
„	„	22	„	5	3	4
Maus 22	Milz, außerordentlich stark infiziert	23	„	12	5–6	5
Maus 8	„	24	„	7	6	7
dieselbe	dieselbe	25	„	7	1	5
„	„	26	„	8	1	3
„	„	27	„	7	6	7
Maus	Milz, gut infiziert	28	„	7	3	4
dieselbe	dieselbe	29	„	9	3	7
„	„	30	„	11	4	7
„	„	31	„	8	3	7
„	„	32	„	8	4	5
„	„	33	„	7	3	6
„	„	34	Meerschw.	11	3	6
„	„	35	„	11	5	7
„	„	36	„	7	3	6
„	„	37	„	8	4	6
„	„	38	„	7	3	4

[1]) Von 3 Kontrollmäusen, die ebenfalls am 17. 10. je $^1/_{200000}$ Öse Milzbrandkultur erhielten, verendeten zwei am 29. 10, eine am 30. 10. 11.

[2]) Von 5 Kontrollmäusen und 3 Kontrollmeerschweinchen, die gleichzeitig je $^1/_{200000}$ Öse Milzbrandkultur erhalten haben, verendete 1 Kontrollmaus am 16. 12., 2 Kontrollmäuse am

Zeit	Tag der Impfung 1911	Verlauf	Bemerkungen
nach 20 Minuten	23. 9.	Maus 19 macht am 25. 9. einen etwas kranken Eindruck.	Maus 19 wurde am 12. 10. mit $^1/_2$ Öse Milzbrandkultur nachgeimpft. Tod am 13. 10. an Milzbrand.
nach $^1/_2$ Stunde	23. 9.	Maus 20 am 25. und 26. schwerkrank, erholt sich am 27., am 28. wieder munter.	Maus 20 wurde am 12. 10. mit $^1/_2$ Öse Milzbrandkultur nachgeimpft. Tod am 13. 10. an Milzbrand.
nach 1 Stunde	23. 9.	Am 26. 9. Maus 21 tot an Milzbrand, am Bauch sulziges Ödem.	—
nach 2 Stunden 10 Minuten	23. 9.	Am 25. 9. Maus 22 tot an Milzbrand. Auf der Bauchmuskulatur 3 kleine stecknadelkopfgroße Buckel mit sulziger Umgebung.	—
nach 6 Stunden	25. 9.	—	Maus 23 wurde am 12. 10. mit $^1/_2$ Öse Milzbrandkultur subkutan nachgeimpft. Tod am 14. 10. an Milzbrand.
nach 5 Stunden	14. 10.	Maus 24 macht vom 16. 10. ab einen etwas kranken Eindruck. Räudekrank.	Maus 24 wurde am 27. 10. mit $^1/_{200000}$ Öse Milzbrandkultur nachgeimpft. Tod am 31. 10. an Milzbrand.
„	14. 10.	—	Maus 25 wurde am 27. 10. mit $^1/_{200000}$ Öse Milzbrandkultur nachgeimpft. Tod am 31. 10. an Milzbrand.
„	14. 10.	Maus 26 macht vom 16. 10. ab einen etwas kranken Eindruck. Räudekrank.	Maus 26 wurde am 27. 10. mit $^1/_{200000}$ Öse Milzbrandkultur nachgeimpft. Tod am 29. 10. an Milzbrand.
„	14. 10.	—	Maus 27 wurde am 27. 10. mit $^1/_{200000}$ Öse Milzbrandkultur nachgeimpft. Tod am 29. 10. an Milzbrand [1]).
nach $^1/_2$ Stunde	28. 11.	Maus 28 am 4. 12. tot an Milzbrand. Kolossales Ödem am Bauch.	
„	28. 11.	—	Die 5 überlebenden Mäuse wurden am 15. 12. 11 mit je $^1/_{200000}$ Öse Milzbrandkultur nachgeimpft. 2 verendeten am 17., 2. am 18. und 1 am 20. 12. 11.
„	28. 11.	—	
„	28. 11.	—	
„	28. 11.	—	
„	28. 11.	—	
„	28. 11.	Meerschw. 34 am 30. 11. tot an Milzbrand.	
„	28. 11.	Meerschw. 35 am 30 11. tot an Milzbrand.	2 überlebende Meerschweinchen wurden am 15. 12. mit je $^1/_{100000}$, 1 Meerschweinchen mit $^1/_{200000}$ Öse Milzbrandkultur nachgeimpft. 2 verendeten am 17. und 1 am 22. 12. 11 [2]).
„	28. 11.	—	
„	28. 11.	—	
„	28. 11.	—	

17. 12, 2 Kontrollmäuse am 18. 12., 1 Kontrollmeerschweinchen am 19. 12., 2 Kontrollmeerschweinchen am 20. 12. 1911.

Eine gestochene Maus und ein gestochenes Meerschweinchen lebten 2 Tage länger als die übrigen gestochenen und als die Kontrollmäuse.

Überimpfling	Kadaverteil	Nr. des Impflings	Impfling	Zahl der Fliegen im Glase	Zahl der Fliegen, die stachen		Zeit	Tag des Versuchs 1911	Verlauf	Bemerk.
					am Kadaver	am Impfling				
Maus	Milz	39	Meerschweinchen	Nicht aufgezeichnet	10	12	nach $^1/_2$ Stunde	30. 12.	—	—
dieselbe	dieselbe	40	„		8	11	„	30. 12.	—	—
„	„	41	„		4	5	„	30. 12.	—	—
„	„	42	„		5	6	„	30. 12.	Meerschw. 42 tot am 2. 1. 12 an Milzbrand	—
„	„	43	„		5	7	„	30. 12.	—	—
„	„	44	„		5	8	„	30. 12.	—	—
„	„	45	„		6	8	„	30. 12.	—	—
„	„	46	„		3	8	„	30. 12.	—	—
„	„	47	„		6	8	„	30. 12.	—	—
„	„	48	„		3	3	„	30. 12.	—	—
„	„	49	„		4	7	„	30. 12.	—	—
„	„	50	„		2	4	„	30. 12.	—	—
„	„	51	„		7	9	„	30. 12.	Meerschw. 51 tot am 2. 1. 12 an Milzbrand	—
„	„	52	„		6	9	„	30. 12.	—	—
„	„	53	„		5	6	„	30. 12.	—	—
„	„	54	„		3	7	„	30. 12.	—	—
„	„	55	„		1	4	„	30. 12.	—	—
„	„	56	„		5	7	„	30. 12.	—	—
„	„	57	„		6	9	„	30. 12.	Meerschw. 57 tot am 2. 1. 12 an Milzbrand	—
„	„	58	„		3	6	„	30. 12.	—	—

Schließlich wurde eine Maus (Nr. 7) von 2 Fliegen gestochen, die unmittelbar vorher an der Milz eines Meerschweinchens gesogen hatten, und ging nach 2 Tagen an Milzbrand ein, während ein Meerschweinchen (Nr. 8), das von einer an einem Meerschweinchen infizierten Fliege gestochen wurde, zwar einige Tage lang nach dem Stich einen kranken Eindruck machte, aber erst der 6 Tage später erfolgten Nachimpfung mit Milzbrand erlag.

Von großem Interesse sind natürlich die Versuche, bei denen zwischen dem Saugen am Kadaver und dem Stechen am gesunden Versuchstier eine gewisse Zeit verstrichen war; denn die Möglichkeit der Verschleppung und Ausbreitung der Krankheitskeime, und damit die praktische Bedeutung sind, wie wir schon oben für Rekurrens ausgeführt haben (vergl. S. 210), um so größer, je länger die Fliegen befähigt bleiben, eine neue Infektion hervorzurufen. Wir haben solche Versuche mit Innehaltung verschiedener Zeiträume ausgeführt.

Zwei Versuche, bei denen die Fliegen 10 Minuten nach dem Ansetzen an die Bauchorgane eines Meerschweinchenkadavers auf je eine Maus (Nr. 9 und 10) angesetzt wurden, verliefen positiv. In einem Falle (Nr. 9) hatte eine Fliege die tödliche Infektion, der die Maus in der Nacht zum vierten Tage erlag, herbeigeführt. Im

zweiten Falle, bei welchem 2 Fliegen stachen (Nr. 10), bildete sich am Bauche der schwerkranken Maus eine geschwulstartige Vorwölbung; das Tier wurde am 5. Tage getötet. Das sulzige Ödem erstreckte sich über den ganzen Bauch; im Ödem wie in der Leber wurden Milzbrandbazillen nachgewiesen.

Bei einer weiteren Versuchsreihe (Nr. 11, 14, 16—18) stachen die Fliegen nach 20 Minuten, $^1/_2$ Stunde, 1, 2, 23, 24 (2 Versuche) Stunden. Alle Versuche waren negativ; doch waren die Organe der Maus, an denen die Fliegen zuerst gesogen hatten, nur mäßig infiziert gewesen.

In einer Reihe von vier Versuchen (Nr. 19—22), wurden die Fliegen, die an der Leber eines stark infizierten Meerschweinchens gesogen hatten, nach einer Pause von je 20 Minuten (Nr. 19), 30 Minuten (Nr. 20), 1 Stunde (Nr. 21), 2 Stunden 10 Minuten (Nr. 22) an die zur Infektion benützten Mäuse angesetzt. Die beiden ersten Tiere (Nr. 19 und 20) machten am zweiten und dritten Tage nach dem Stechen einen kranken Eindruck, erholten sich jedoch wieder und gingen erst an einer Nachimpfung mit je $^1/_2$ Öse Milzbrandkultur zugrunde. Dagegen erlagen die beiden Mäuse, welche nach längerer Pause gestochen worden waren, der Infektion. Die nach 1 Stunde gestochene Maus war am 3. Tage tot; sie zeigte die gewöhnlichen Erscheinungen, Ödem an der Stichstelle und vergrößerte Milz, in welcher die Bazillen nachgewiesen werden konnten. Die nach 2 Stunden 10 Minuten gestochene Maus ging schon am 2. Tag ein; sie bekam am Bauche drei stecknadelkopfgroße Buckel mit sulziger Umgebung, und die vergrößerte Milz enthielt ganz außerordentlich zahlreiche Milzbrandstäbchen.

Ein Versuch, durch Fliegen, welche an dieser Milz gesogen hatten, nach 6stündiger Pause eine andere Maus (Nr. 23) zu infizieren, hatte keinen Erfolg. Ebenso zeigten vier weitere Versuche mit 5stündiger Pause, die später angestellt wurden, ein negatives Ergebnis (Nr. 24—27).

Schließlich sind noch zwei Versuchsreihen mit $^1/_2$stündiger Pause angestellt worden. Bei der einen Reihe von 11 Versuchen stachen die Fliegen an 6 Mäusen und 5 Meerschweinchen, von denen 1 Maus und 2 Meerschweinchen an Milzbrand eingingen. Erwähnenswert ist, daß die überlebenden Tiere dieser Reihe später mit $^1/_{100000}$ bezw. $^1/_{200000}$ Öse Milzbrandkultur nachgeimpft wurden, und daß eine Maus und ein Meerschweinchen um je 2 Tage länger lebten, als die übrigen Tiere der Reihe und als die Kontrolltiere. Bei der anderen Reihe, zu welcher 20 Meerschweinchen verwendet wurden, erlagen drei Tiere unter den typischen Erscheinungen der Infektion.

Das Gesamtergebnis der Übertragungsversuche zeigt in übersichtlicher Weise die nachstehende Tabelle, wobei nur bemerkt wird, daß die Fälle, in denen die Tiere zwar krank erschienen, die Krankheit aber nicht durch den Sektionsbefund und Bakteriennachweis festgestellt wurde, nicht als positiv gerechnet werden.

Die längste Zeit, nach welcher in unseren bisherigen Versuchen die Fliegen eine Infektion auszuführen imstande waren, betrug also 2 Stunden 10 Minuten. In zwei Fällen, einmal bei sofortigem Weitersaugen, das andere Mal nach Unterbrechung des Saugaktes von 10 Minuten, erfolgte die Infektion auf den Stich **einer** Fliege.

Die Fliegen wurden angesetzt	Infektion	Keine Infektion nachgewiesen
sofort	4	1
nach 10 Minuten	2	—
„ 20 „	—	2
„ 30 „	6	27
„ 1 Stunde	1	1
„ 2 Stunden	—	1
„ 2 „ 10 Minuten	1	—
„ 5 „	—	4
„ 6 „	—	1
„ 23 „	—	1
„ 24 „	—	2

Bei allen bisher besprochenen Versuchen waren die Fliegen an die Organe verendeter Tiere angesetzt worden. Wir haben jedoch, wie oben (S. 221) erwähnt, auch einen Versuch am lebenden infizierten Tier angestellt. Hierbei war also ausgeschlossen, daß die Fliegen sporenhaltiges Material aufgenommen hätten, sie mußten vielmehr, was ja auch bei den übrigen Versuchen wohl zweifellos meistens der Fall war, lebende Stäbchen aufgenommen und durch diese die Übertragung ausgeführt haben.

Datum 1912	Objekt, von welchem übertragen	Gesamtzahl der Fliegen	Zahl der stechenden Fliegen	Tierart, welche von infizierten Fliegen gestochen	Zeit zwischen Übertragung	Nummer des Tieres	Zahl der weiter stechenden Fliegen am Impfling	Datum, an welchem die Tiere gestorben
22. 1.	Von einer lebenden Maus, welche reichlich Milzbrandbazillen im Blute hat (geimpft 21.1.12^{30}).	7	4	Meerschweinchen	sofort	1	5	—
„		11	7		„	2	6	—
„		7	5		13 Min.	3	5	—
„		12	8	„	10 „	4	10	24.I. 5 Nm. Sulz. Ödem mit Bakt. Milz groß, teigig, ungeheuer stark infiziert.
„	11^{00} ganz wenige Bakterien,	10	6	„	20 „	5	5	—
„	um 2^{30} viele; um 5 Uhr gestorben.	5	3	„	20 „	6	3	—

Wie die Tabelle zeigt, ist von 6 Versuchen einer gelungen, und zwar von jenen, bei welchen eine Pause von 10 Minuten zwischen dem Saugen am gesunden und am kranken Tier vergangen war. Dieser Versuch genügt, um zu beweisen, daß die Übertragung des Milzbrandes vom lebenden Tiere durch Fliegenstiche möglich ist, wenigstens dann, wenn zur Zeit des Stiches Bazillen im Blute vorhanden sind.

Es war ja eigentlich von vornherein wahrscheinlich, daß die Infektion, wenn sie mit am Kadaver gefütterten Fliegen gelang, auch bei Fütterung am lebenden Tiere erfolgreich sein werde, da ja bei Milzbrand, wie bekannt, schon außerordentlich geringe Mengen von Bakterien genügen, um eine Ansteckung herbeizuführen. Immerhin

glaubten wir, zur Vervollständigung unserer Ergebnisse diesen Versuch ausführen zu müssen. Daß auch Versuche an größeren geeigneten Tieren erfolgreich sein würden, erscheint uns aus dem gleichen, eben angegebenen Grunde nicht zweifelhaft.

Warum in dem Versuche am lebenden Tier, ebenso wie in den Versuchen am Kadaver, nicht jeder Stich eine Infektion herbeiführte, bedürfte genauerer Untersuchung.

Um die praktische Bedeutung dieser Ergebnisse bewerten zu können, ist es notwendig, nochmals auf die schon an einer anderen Stelle dieser Arbeit, bei Gelegenheit der Rekurrensversuche (S. 212) besprochene Verbreitungsmöglichkeit der Fliegen zurückzukommen. Wie die dort angeführten Versuche von Copeman, Howlett und Merriman gezeigt haben, konnten gezeichnete Fliegen noch in einer Entfernung von ungefähr $1^1/_2$ Kilometer von der Stelle, an der man sie hatte auffliegen lassen, nachgewiesen werden. Bei der Schwierigkeit, in solcher Entfernung die verhältnismäßig wenigen, über einen großen Raum zerstreuten Fliegen wieder anzutreffen und einzufangen, darf man aber wohl annehmen, daß $1^1/_2$ Kilometer nicht die äußerste Entfernung, zu der die Fliegen durch eigene Fortbewegung gelangen können, darstellt. Nach den früher angeführten Versuchen der englischen Forscher könnte ferner eine Fliege in 2 Stunden 10 Minuten, der Zeitdauer unseres längsten Übertragungsversuchs, die Entfernung von etwa 2 Kilometer zurückgelegt haben. Es muß außerdem in Betracht gezogen werden, daß Fliegen, die sich für kürzere oder längere Zeit auf in Bewegung befindliche Tiere oder auf menschliche Transportmittel niederlassen, in dieser Zeit von über 2 Stunden wohl in weit größere Entfernungen als 2 Kilometer gelangen können. Daraus aber folgt, daß eine Fliege, die Milzbrandkeime aufgenommen hat, imstande ist, die Krankheit in einem Umkreis von wenigstens zwei Kilometern und bei passiver Verschleppung sogar in einem noch erheblich größeren Gebiete hervorzurufen.

Als Gelegenheiten zur Aufnahme der Milzbrandkeime durch Stechfliegen unter natürlichen Verhältnissen kommen in Betracht: das Saugen am infizierten Tier, das Saugen am geöffneten Kadaver und die Aufnahme von Blut, das vom kranken oder verendeten Tier entleert worden ist.

Daß *Stomoxys* extravasales Blut aufnimmt, ist im Versuch leicht zu bestätigen und auch von anderen Beobachtern schon festgestellt worden. Es ist daher sehr leicht möglich, daß Blut, das von schwerkranken oder frisch verendeten Tieren aus den Körperöffnungen, Mund, Nase, After, entleert wurde, von Stechfliegen aufgenommen wird.

Daß die Fliegen, zwar weniger gern als am lebenden Tier, aber immerhin doch häufig genug, am geöffneten Kadaver saugen, geht, wenn es einer Bestätigung bedürfte, aus unseren eigenen Versuchen hervor. Hierbei bevorzugen sie die blutreichen Organe, Milz und Leber, in denen die Bakterien in der Regel gerade am reichlichsten vorhanden sind. Die Gelegenheit hierzu ist in der Praxis gegeben bei Sektionen milzbrandkranker Tiere und bei der Verarbeitung von Kadavern in Abdeckereien. Wo, wie in Deutschland, die Abhäutung der an Milzbrand gefallenen Tiere verboten, und

die Vornahme von Sektionen ohne polizeiliche Erlaubnis nur approbierten Tierärzten gestattet ist, da ist diese Gelegenheit natürlich erheblich eingeschränkt. In Betracht kommen dagegen die wohl nicht ganz seltenen Fälle, in denen die Notschlachtung und Zerlegung von Tieren erfolgt, bevor oder ohne daß die Krankheit als Milzbrand erkannt worden ist.

Hinsichtlich der Aufnahme von Milzbrandkeimen durch Saugen am lebenden Tiere ist vor allem zu beachten, daß die Bazillen im peripheren Blute nur zeitweise in größeren Mengen vorhanden sind; in der Regel ist dies nur in der Zeit kurz vor dem Tode der schwer erkrankten Tiere der Fall. Sie finden sich ferner, allerdings nicht immer in erheblicher Menge, im sulzigen Ödem der Haut.

Aus alledem ergibt sich, daß die Aufnahme von Milzbrandkeimen durch stechende Fliegen sowohl am lebenden wie am toten Tiere gewissen Einschränkungen unterworfen ist, und daß nicht jedes kranke Tier dauernd und ohne weiteres den Stechfliegen die Möglichkeit bietet, die Krankheit durch ihren Stich weiter zu verschleppen. Schon der älteren, nicht exakt experimentell begründeten Auffassung Davaines, die Stechfliegen als Überträger des Milzbrandes in Anspruch zu nehmen, hat man entgegengehalten, daß die Stechfliegen keine wichtige Rolle spielen könnten, weil sonst die Verheerungen noch schlimmer sein müßten. Darauf antwortete Davaine (1870b), daß die Zahl der Stechfliegen sehr schwanke, daß die Bazillen nur kurz vor dem Tode im Blut erscheinen, daß sich die Fliegen nicht von toten Tieren ernähren und sich nur während des Tages bewegen[1]). Diesen Ausführungen Davaines ist wohl zuzustimmen, mit Ausnahme der Angabe, daß die Fliegen sich nicht von toten Tieren ernähren. Denn es unterliegt wohl keinem Zweifel, daß die Fliegen ebenso, wie es in unseren Versuchen geschah, gelegentlich auch unter natürlichen Bedingungen am Kadaver, besonders am geöffneten, saugen werden.

Immerhin aber scheint auch uns die Möglichkeit der Milzbrandübertragung durch Stechfliegen eine beschränkte zu sein. Damit ist aber nicht gesagt, daß sie als unwichtig bezeichnet oder überhaupt ganz vernachlässigt werden darf. Bei Untersuchung der Verbreitungsart einer Seuche handelt es sich doch darum, alle Möglichkeiten, die hierbei in Betracht kommen können, festzustellen. Mag auch, worauf wir schon früher (1911, S. 390) hingewiesen haben, z. B. die Verschleppung von Typhus, Cholera usw. durch Stubenfliegen nur eine unter manchen anderen Arten der Verbreitung der Krankheitskeime darstellen, so wird man sie doch nicht ganz außer acht lassen dürfen. Das Gleiche erscheint uns für die Verschleppung und Übertragung des Milzbrandes durch Stechfliegen zu gelten.

Wir sind durchaus der Meinung, daß die gewöhnliche Art der Verbreitung des Milzbrandes bei Tieren und beim Menschen, insbesondere auch, soweit er als Krankheit der inneren Organe auftritt, durch die Forschungen von Robert Koch und zahlreichen anderen Forschern im wesentlichen aufgeklärt ist, und haben nicht die Absicht, an längst- und wohlbegründeten Tatsachen auch nur im geringsten zu zweifeln

[1]) Vergl. Nuttall (1899, S. 212).

oder ihre Bedeutung in Frage zu ziehen[1]). Es liegt uns auch ferne, etwa behaupten zu wollen, daß alle, oder auch nur die meisten Fälle von Hautmilzbrand, besonders beim Menschen, auf Fliegenstiche zurückzuführen sind. Die Entstehung von Hautmilzbrand durch Infektion von Hautwunden bei der Arbeit an Milzbrandkadavern ist in zahlreichen Fällen mit so unumstößlicher Sicherheit bewiesen, daß es widersinnig wäre, daran irgendwie zweifeln zu wollen. Was wir aber bewiesen haben, ist zunächst: daß die alten und immer wiederkehrenden Angaben über die Entstehung eines Teiles der Fälle von Hautmilzbrand beim Menschen durch Fliegenstiche berechtigt sind. Denn daß diese Art der Übertragung möglich ist, war bisher nicht erwiesen, und wo sie als möglich angesehen wurde, geschah dies eigentlich nur auf Grund der volkstümlichen Erfahrung.

In der Literatur wird mehrfach über Fälle berichtet, in denen die betroffenen Personen mit milzbrandkranken Tieren oder mit Kadavern von solchen nicht in Berührung gekommen und durch Fliegenstiche infiziert worden sein sollen[2]). Diese Fälle erscheinen nunmehr in einem ganz anderen Licht. Wenngleich es natürlich jetzt nicht mehr möglich ist, für jeden einzelnen der zum Teil weit zurückliegenden Fälle festzustellen, ob die Infektion tatsächlich auf den Stich einer Fliege hin erfolgt ist oder anders erklärt werden muß, so dürfen die Angaben, daß eine Infektion durch einen Fliegenstich erfolgt sei, jetzt nicht mehr, wie es früher häufig geschah, einfach als unglaubwürdig bezeichnet werden. Man kann vielmehr jetzt wohl als erwiesen betrachten, daß milzbrandkranke Tiere und die Kadaver von solchen bei Anwesenheit von Stechfliegen, im besonderen von *Stomoxys calcitrans*, auch für Personen, welche nichts mit den Tieren unmittelbar zu tun haben, gefährlich werden können, und zwar nicht nur in der allernächsten, sondern auch noch in einer gewissen weiteren Umgebung.

Eine andere Frage ist, ob die Möglichkeit der Übertragung des Milzbrandes durch Fliegenstiche in der Epidemiologie des tierischen Milzbrandes eine Rolle spielen kann. Manche früheren Forscher (vergl. die Zusammenstellung bei Nuttall 1899) haben den Stechfliegen eine große Bedeutung für die Ausbreitung der Seuche unter den Tieren beigelegt. Wie wir oben schon erwähnt haben, halten wir zwar an der Anschauung, daß die größte Menge der Milzbrandfälle auf andere Weise entsteht, unbedingt fest. Wenn aber im Versuch, und darnach wahrscheinlich auch beim Menschen, die Übertragung durch Insektenstiche möglich ist, so ist nicht einzusehen, warum dies nicht auch bei Tieren unter natürlichen Bedingungen der Fall sein sollte.

Die Erkrankungen an Hautmilzbrand verlaufen viel gutartiger als die an inneren

---

[1]) Koch gibt zwar, außer der Infektion von Wunden durch getrocknete Bazillen, auch die Möglichkeit der Übertragung des Milzbrandes durch Insektenstiche zu. „Die eigentliche Masse der Erkrankungen aber . . kann — nach ihm — nur durch die Einwanderung von Sporen des Bacillus anthracis in den Tierkörper verursacht werden“ (1876, S. 303; 1881, S. 2; vergl. ferner Koch, Gaffky und Löffler 1884, S. 165). Eigene Übertragungsversuche mit Insekten werden von Koch nicht erwähnt.

[2]) Vergl. die ausführliche Zusammenstellung bei Nuttall (1899).

Organen[1]). Es muß daher als im Bereiche der Möglichkeit liegend angesehen werden, daß leichtere, nicht tödlich verlaufende Fälle von Hautmilzbrand bei Tieren um so eher unerkannt bleiben, als diese den Tierärzten in der Regel nicht zu Gesicht kommen werden. Derartige Fälle könnten aber wohl unter Umständen den Ausgangspunkt für weitere Infektionen bilden, sei es durch Vermittlung stechender Insekten, sei es durch Kontakt oder durch die Ausstreuung von Sporen, die sich vielleicht an offenen Pusteln gebildet haben und dann eine Infektion anderer Tiere per os herbeiführen können. Da die Fliegen, wie oben angeführt wurde, nach unseren bisherigen Versuchen die Infektion auf einem Umkreis von mindestens 2 Kilometern verschleppen können, so wäre wohl nicht undenkbar, daß auf dem angedeuteten Wege die Stechfliegen Veranlassung zur Entstehung neuer Krankheitsherde geben könnten. In sehr vielen Fällen läßt sich ja mit Sicherheit nachweisen, daß die Seuche daraus entstand, daß am gleichen Orte schon früher Tiere an Milzbrand gefallen waren. Wir glauben aber doch, daß bei Feststellung der Entstehungsart einer Erkrankung künftighin auch die Möglichkeit der Verschleppung durch Stechfliegen in Betracht gezogen werden sollte, und daß vielleicht der eine oder andere Fall der Entstehung neuer Krankheitsherde oder das Auftreten mancher sporadischer Erkrankungen auf diese Weise zu erklären sein könnte. Wo allerdings der Milzbrand einmal als Erkrankung der inneren Organe aufgetreten ist, da ist die Ausstreuung von Keimen in dem Maße möglich, daß die Übertragung durch *Stomoxys*-Stiche wohl weniger in Betracht kommt, als die Infektion per os. Erstere ist zwar dann ebenfalls noch möglich, ebenso wie die von Bongert bewiesene Übertragung auf Schafe der gleichen Herde durch *Melophagus*; beide Infektionsarten werden aber dann gegenüber den viel bösartiger verlaufenden Fütterungs-Infektionen wohl nur eine untergeordnetere Rolle spielen und vor allem von diesen in der Praxis kaum noch zu sondern sein.

Literatur:

Bermbach, Veröffentlichungen aus den Jahres-Veterinär-Berichten der beamteten Tierärzte Preußens für das Jahr 1901. 2. Jahrg. 1. Teil. 1902.

Bongert, Diskussion zu dem Vortrag von Kuhn. In: Zentralbl. Bakt. Parasitenk. I. Abteil. Bd. XLVII. Beiheft 1910, S. 155*.

Burkhardt, Ergebnis der durch Bundesratsbeschluß vom 8. Juli 1909 eingerichteten Statistik der Milzbrandfälle unter Menschen für das Jahr 1910. In: Medizinal-statist. Mitteil. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte. Berlin. 14. Bd., 2. Heft. 1911.

Copeman, S. M., Howlett, F. M. and Merriman, G., An Experimental Investigation on the Range of Flight of Flies. In: Reports to the Local Government Board on Public Health and Medical Subjects. New. Ser. No. 53 (Further Reports [No. 4] on Flies as Carriers of Infection). London, 1911.

---

[1]) Von 287 in der Zeit vom 1. Januar bis 31. Dezember 1910 im Deutschen Reiche auf Grund der amtlichen Erhebungen festgestellten menschlichen Milzbrandfällen betrafen 10 Milzbrand innerer Organe (3,5%), die übrigen 277 Erkrankungen Hautmilzbrand (95,6%). Von Milzbrand innerer Organe endeten 9 tödlich, d. h. 90%, von Hautmilzbrand dagegen nur 31, d. i. 11,2%. Vergl. Burkhardt (1911).

Davaine, C., Études sur la contagion du charbon chez les animaux domestiques. In: Bull. de l'acad. de méd. Paris XXXV. 1870.

Derselbe, Étude sur la genèse et la propagation du charbon. In: Bull. de l'acad. de méd. Paris XXXV. 1870.

Fehrmann, E., Das Rekurrensfieber in St. Petersburg. In: Arch. f. Schiffs- u. Tropen-Hyg. 14. Bd., Heft XXI. 1910.

Friedberger, F. und Fröhner, E., Lehrbuch der speziellen Pathologie und Therapie der Haustiere. 6. Aufl. Stuttgart 1904.

Galli-Valerio, B., Les insects comme propagateurs de maladies. Le rôle des arthropodes dans la dissémination des maladies. In: Bericht über den XIV. Internat. Kongreß f. Hyg. und Demogr. Berlin 1907. (1908.) Bd. II.

Derselbe, L'état actuel de nos connaissances sur le rôle des mouches dans la dissémination des maladies parasitaires et sur les moyens de lutte à employer contre elles. In: Zentralbl. Bakt. Abt. I. Orig. LIV. 1910.

Graham-Smith, On some cases of relapsing fever in Egypt and the question of carriage by domestic vermin. London 1909.

Derselbe, Recherches expérimentales sur la spirillose humaine. In: Annales de l'Instit. Pasteur. 24me Année, No. 5. 1910.

Graham-Smith, G. S., Further Observations on the Ways in which Artificially Infected Flies (*Musca domestica* and *Calliphora erythrocephala*) carry and distribute pathogenic and other Bacteria. In: Reports to the Local Government Board on Public Health and Medical Subjects. New. Ser. No. 53 (Further Reports [No. 4] on Flies as Carriers of Infection). London 1911.

Hewitt, C. G., The House Fly. *Musca domestica* Linnaeus. A Study of its Structure, Development Bionomics and Economy. Manchester 1910. [Die einzelnen Teile erschienen vorher in Quart. Journ. Microc. Sc. N. S. Vol. 51; 52; 54.]

Hutyra, F., und Marek, J., Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere. Jena 1906.

Jahresbericht über die Verbreitung von Tierseuchen im Deutschen Reiche. Bearbeitet im Kaiserl. Gesundheitsamte. 21. Jahrg. Das Jahr 1906. Berlin 1907.

Joly, P. R., Importance du rôle des insectes dans la transmission des maladies infectieuses et parasitaires. Thèse. Bordeaux. 1898.

Koch, R., Die Ätiologie der Milzbrandkrankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des Bacillus Anthracis. In: Beiträge zur Biologie der Pflanzen, herausgeg. von F. Cohn. 2. Bd. 1876. (Neuer Abdruck in: Sudhoff, Klassiker der Medizin. Bd. 9. Leipzig 1910.)

Derselbe, Zur Ätiologie des Milzbrandes. In: Mitteilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte. Berlin. Bd. 1, Nr. 2, 1881.

Koch, R., Gaffky und Löffler, Experimentelle Studien über die künstliche Abschwächung der Milzbrandbazillen und Milzbrandinfektion durch Fütterung. In: Mitteilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte. Berlin. Bd. 2. 1884.

Kolle, W. und Hetsch, H., Die experimentelle Bakteriologie und die Infektionskrankheiten. 3. Aufl. Berlin und Wien. 1911.

Kuhn, Ph. und E. Kuhn, Ergebnisse von Pferdesterbeimpfungen an Hunden. In: Zeitschr. f. Immunitätsforschung u. experim. Therapie. 8. Bd. 5. u. 6. Heft. 1911.

Kuhn, Ph., Diskussionsbemerkung zu dem Vortrag von Reinecke: „Der heutige Stand unserer Kenntnis von der Pferdesterbe." In: Verh. des Kolonialkongresses 1910.

Derselbe, Erwiderung auf den Aufsatz von W. Rickmann: „Ein Beitrag zur Pest der Einhufer (Pferdesterbe)." In: Berl. Tierärztl. Wochenschr. 1911, Nr. 49.

Mackie, F. P., The Part played by *Pediculus corporis* in the transmission of relapsing fever. In: Brit. med. Journ. 1907.

Manteufel, P., Experimentelle Untersuchungen zur Epidemiologie des europäischen Rückfallfiebers. In: Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. XXIX, Heft 2. 1908.

Derselbe, Über den gegenwärtigen Stand unserer Kenntnis von der Bedeutung der Arthropoden als Überträger von Infektionskrankheiten bei Wirbeltieren. In: Zool. Zentralbl. 16. Bd., Nr. 2/3. 1909.

Mühling, P., Die Übertragung von Krankheitserregern durch Wanze und Blutegel. In: Zentralbl. Bakt. Parasitenk. I. Abt. XXV. 1899.

Nattan-Larrier, E., Spirilles de la fièvre récurrente et mouches. In: Bull. Soc. pathol. exot. T. IV, 1911, Nr. 5.

Nuttall, G. H. F., Zur Aufklärung der Rolle, welche stechende Insekten bei der Verbreitung von Infektionskrankheiten spielen. Infektionsversuche an Mäusen mittels mit Milzbrand, Hühnercholera und Mäuseseptikämie infizierter Wanzen und Flöhe. In: Zentralbl. Bakt. Parasitenk. I. Abt. XXIII. 1898.

Derselbe, Die Rolle der Insekten, Arachniden (Ixodes) und Myriopoden als Träger bei der Verbreitung von durch Bakterien und tierische Parasiten verursachten Krankheiten des Menschen und der Tiere. Eine kritisch-historische Studie. In: Hygienische Rundschau. IX. Jahrg. 1899.

Derselbe, Insects as carriers of disease. Recent advances in our knowledge of the part played by blood-sucking Arthropods (exclusive of Mosquitos and Ticks) in the transmission of infective diseases. In: Bericht über den XIV. Internat. Kongreß f. Hyg. u. Demogr. Berlin 1907 (1908). Bd. II.

Pilf, Drei Erkrankungen an Milzbrand. In: Zeitschr. f. Medizinalbeamte. 17. Jahrg. 1904.

Profé, Der Milzbrand. Referat im Auftrage des Vereins beamteter Tierärzte Preußens erstattet. In: Fortschr. d. Vet. Hyg. Bd. 4. 1906.

Roubaud, E., Études sur les Stomoxydes du Dahomey. In: Bull. Soc. pathol. exot. T. IV, Nr. 2. 1911.

Schuberg u. Kuhn, In: Zentralbl. Bakt. Parasitenk. I. Abteil. Bd. XLVII. Beiheft. 1910, S. 155*.

Schuberg, A. und Kuhn, Ph., Über die Übertragung von Krankheiten durch einheimische stechende Insekten. I. Teil. In: Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte. Berlin. Bd. XXXI. Heft 2. 1911.

Schuberg, A. und Schubotz, H., Zur Frage der Geflügelpocken. In: Zentralbl. Bakt. Parasitenkunde. I. Ref. Bd. XLVII. Beiheft 1910.

Sergent, E. et Foley, H., Fièvre récurrente du Sud-Oranais et *Pediculus vestimenti*. Note préliminaire. In: Bull. Soc. path. exot. T. I, No. 3, 1908.

Dieselben, Recherches sur la fièvre récurrente et son mode de transmission, dans une épidémie algérienne. In: Annales de l'Instit. Pasteur. 24me Année, No. 5. 1910.

Sobernheim, G., Milzbrand. In: Kolle-Wassermann, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. 2. Bd. Jena 1903.

Terni, Diskussion zu Thema 7: Insekten als Verbreiter von Krankheiten. In: Bericht über den XIV. Internat. Kongreß f. Hyg. u. Demogr. Berlin 1907 (1908) Bd. IV, S. 132.

Uhlenhuth, P. und Händel, E., Vergleichende Untersuchungen über die Spirochaeten der in Afrika, Amerika und Europa vorkommenden Rekurrenserkrankungen. In: Arb. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte. Berlin. 26. Bd. 1907.

Über Zelleinschlüsse bei Trachom und Conjunctivitiden.

Von

Dr. W. Böing,

Wissenschaftlicher Hilfsarbeiter im Kaiserlichen Gesundheitsamte.

Im Jahre 1907 fanden Halberstädter und v. Prowazek in den Epithelzellen der Augenbindehaut von Trachomkranken und mit Trachom infizierten Affen eigenartige Einschlüsse, die sie als Entwicklungsstadien von Mikroorganismen auffaßten und zu den Chlamydozoen rechneten. Sie glaubten, in ihnen den Erreger des Trachoms gefunden zu haben. Bei Nachprüfungen wurde das Vorkommen dieser Gebilde bestätigt; weiterhin aber wurden sehr ähnliche oder gleiche Gebilde auch bei gonorrhoischen und — häufiger — nichtgonorrhoischen Erkrankungen der Augen, besonders bei der Blennorrhöe der Säuglinge beschrieben, bei der Urethritis und bei Cervixkatarrh (Heymann, Halberstädter und v. Prowazek, Lindner u. a.) Dies führte dazu, einen Zusammenhang anzunehmen zwischen Trachom und gewissen Formen von Blennorrhöe. Die oben genannten Autoren fanden, daß durch Übertragung von gonokokkenhaltigem Material auf die gereizte Conjunctiva von Affen bei diesen keine blennorrhöeähnlichen Erscheinungen sich erzielen ließen und Zelleinschlüsse nicht nachgewiesen werden konnten, daß andererseits aber gonokokkenfreies, Zelleinschlüsse enthaltendes Sekret aus der Conjunctiva eines Säuglings oder aus dem Genitalapparat der Eltern bei den Affen erst eine blennorrhöe-, dann eine follikulärkatarrhartige Affektion erzeugte, die sich von Affenauge zu Affenauge unter gleichen Erscheinungen weiterimpfen ließ. Hieraus wurde der Schluß gezogen, daß in den Zelleinschlüssen ein besonderes Virus enthalten sein müsse, ein Schluß, der sich mit der ursprünglichen Auffassung Halberstädters und v. Prowazeks deckte, die bei ihren Untersuchungen Gonokokken und Zelleinschlüsse nie gleichzeitig nachweisen konnten. Dieser Anschauung trat unter anderen Flemming entgegen, der die aus diesen Übertragungsversuchen gezogenen Schlüsse nicht für eindeutig hält, sondern betont, daß zugleich mit den Einschlüssen auch anderes infektiöses Material übergeimpft werden und dieses dann ebenfalls die den Trachomkörperchen angeblich zukommenden klinischen und pathologisch-anatomischen Befunde hervorrufen kann. Es sei also der direkte Beweis für die Pathogenität der Trachomkörperchen durch ihre Überimpfbarkeit auf Affen und durch die Weiterverimpfung von Affe zu Affe nicht

erbracht. Bei Beurteilung einer positiven Affenimpfung empfiehlt Flemming größte Vorsicht, da nicht die Follikel allein für Trachom beweisend sind, sondern stets erst die narbige Veränderung der Schleimhaut und der Pannus der Hornhaut. Er sucht an 14 verschiedenen Fällen, und zwar bei

Blennorrhoea neonatorum ohne bakteriellen Befund,
Blennorrhoea neonatorum gonorrhoica,
Blennorrhoea neonatorum mit Pneumokokkenbefund,
Conjunctivitis gonorrhoica der Erwachsenen,
Conjunctivitis follicularis,
Trachom,
Trachom, durch Impfung von Mensch zu Mensch erzeugt,
Conjunctivitis, durch Impfung vom Säugling zum Affen erzeugt,

in kritischer Betrachtung des klinischen Verlaufs und des mikroskopischen Befundes indirekt festzustellen, welche klinische Bedeutung den Körperchen zuzusprechen ist, und kommt zu dem Schluß, daß, abgesehen von den pathologisch veränderten Zellen, in denen die Trachomkörperchen stets anzutreffen seien, die klinischen Symptomenbilder so große Verschiedenheiten aufweisen, daß an eine ihnen allen gemeinsame Ätiologie nicht gedacht werden könne. Den Fällen mit Gonokokken-Befund war es eigentümlich, daß in der ersten Krankheitsperiode Trachomkörperchen nicht gefunden wurden; sie traten erst auf mit dem Nachlassen der Eiterabsonderung, um dann sogar wochenlang nach der Heilung zu bleiben. Ganz besonders traf dies auch für die Conjunctivitiden zu, bei denen Pneumokokken als Erreger angesprochen werden mußten. Beim Trachom verschwinden die Einschlüsse durch die Behandlung sehr schnell, bei den Blennorrhöen usw. dagegen bleibt die Behandlung meist lange ohne jeden Einfluß.

Während dieser Versuche, die Natur der eigenartigen Einschlüsse zu ergründen, trat Herzog mit der neuen Behauptung hervor, die Trachomkörper seien Mikrogonokokken, d. h. Involutionsformen des Gonokokkus Neißer. Die Infektion beim Trachom komme dadurch zustande, „daß diese bisher unbekannten Wachstumsformen des genannten Keimes auf Grund einer symbiotischen Anpassung an einen intraepithelialen Parasitismus sich fortdauernd innerhalb der Epithelzellen der Conjunctiva vermehren, hierselbst dabei die bekannten als Trachomkörper bezeichneten Zoogloeen bildend".

Auf Grund dieser Anschauung bestreitet Herzog auch selbstverständlich die von Halberstädter und v. Prowazek ausgesprochene Protozoennatur der Einschlußkörper; er kommt auf Grund kultureller Feststellung zu der Überzeugung, daß die Hantelteilung die einzige Teilungsart der Involutionsformen des Gonokokkus ist. Zu so weitgehenden Schlüssen liegt meines Erachtens keine Berechtigung vor. Es ist im Gegenteil anzunehmen, daß die Einschlüsse mit Gonokokken sicher nichts zu tun haben; darauf weist auch ihr regelmäßiges Vorkommen in den Conjunctivalzellen der mit Schweinepest behafteten Schweine hin. Meist werden sie bei solchen Schleimhautaffektionen gefunden, bei denen der Nachweis von Gonokokken trotz wiederholter und gründlichster Prüfung nicht gelingt, und die auch in ihren Symptomen und im Verlauf

von den gonorrhoischen Urethritiden und Blennorrhöen oft sich deutlich unterscheiden. Andererseits werden die Einschlußkörperchen bei typischen Gonokokkeninfektionen in der Regel vermißt. Es steht nun außer Zweifel, daß Gonokokken und Einschlußkörper gleichzeitig vorkommen können. Solche Krankheitsfälle bezeichnet Heymann im Gegensatz zu den „Einschlußblennorrhöen" als „Mischblennorrhöen". Auch ich glaube, daß es sich hier um das gleichzeitige Wuchern zweier verschiedener Erreger in der Schleimhaut handelt.

Nach den Ausführungen von Heymann (Berl. Klin. Woch. 1910, S. 663) bestehen bezüglich der Bedeutung der sogenannten Trachomkörperchen drei Möglichkeiten: Lindner kommt auf Grund seiner Untersuchungen und der positiven Menschenimpfungen Wolfrums zu dem Schluß, daß Trachom und Blennorrhoea neonatorum identisch sind, eine Ansicht, der sich jetzt auch Halberstädter und v. Prowazek anschließen, nachdem sie auf Grund ihrer Beobachtungen zunächst angenommen hatten, daß es sich bei den Blennorrhöekörperchen um ein Virus sui generis handele. Heymann hält eine dritte Ansicht für die wahrscheinlichste, daß nämlich die Einschlüsse das Virus der nichtgonorrhoischen Blennorrhöe darstellen und daß sie, wo sie bei Trachom gefunden werden, als Mischinfektionserreger aufzufassen sind.

Endlich sei noch der infektiöse Scheidenkatarrh der Rinder hier erwähnt, als dessen Erreger ein Gram-negativer Streptokokkus gilt. Blaha will bei ihm ebenfalls trachomkörperartige Epithelzelleinschlüsse nachgewiesen haben. Ob seine Befunde in der Literatur Bestätigung gefunden haben, konnte ich nicht feststellen. Jedenfalls enthielten die Originalpräparate, die mir liebenswürdiger Weise von Blaha selbst überlassen wurden, keine typischen oder den Trachomkörperchen ähnliche Zelleinschlüsse. Ich fand in ihnen reichliche Zelldegenerationen der verschiedensten Art, die aber stets als solche zu erkennen waren und sich leicht von den Zelleinschlüssen, besonders beim Vergleich der photographischen Platten, unterscheiden ließen.

Im Winter 1910 begann ich mit der Untersuchung von Conjunctivalzellen auf Einschlüsse. Die ersten Versuche wurden gemeinsam mit Herrn Regierungsrat Neufeld ausgeführt, eine kurze Mitteilung darüber ist in der Mikrobiologischen Vereinigung 1910 gemacht worden. Die Untersuchungen erstreckten sich auf die Dauer fast eines Jahres; für die Überlassung des Materials, das zum größten Teil aus der Neumannschen Poliklinik für Kinderkrankheiten in Berlin stammte, sei Herrn Professor Neumann gebührender Dank erstattet. Vom 26. Februar bis 1. Mai und vom 1. September bis 1. Oktober 1911 wurden im ganzen 86 Conjunctivitiden auf Zelleinschlüsse untersucht. Die Kinder befanden sich in einem Alter von 7 Tagen bis zu 6 Jahren. Einschlüsse wurden gefunden bei 11 Kindern, die alle im Alter unter acht Wochen standen, und zwar fast stets in gonokokkenfreien Fällen, nur einmal bei Blennorrhoea gonorrhoica. In einer durch Infektion der Bindehaut durch den Diphtheriebazillus verursachten Conjunctivitis wurden Einschlüsse nicht gefunden. Auf weitere Einzelheiten dieser Untersuchungen möchte ich nicht eingehen, da sie im allgemeinen den Befunden der früheren Autoren entsprechen; nur folgende Fälle, die Besonderheiten boten, seien erwähnt.

1. H. L., 14 Tage alt, wurde am 5. März 1910 in die Klinik aufgenommen wegen Conjunctivitis gonorrhoica. Das linke Auge war stark gerötet und geschwollen und zeigte eitrige Sekretion. Das rechte Auge war frei. Am 5., 8. und 12. März waren die Befunde auf Einschlüsse trotz sofort einsetzender Behandlung mit Argentum nitricum positiv. Dann verschwanden die Körperchen, das Auge besserte sich zusehends, so daß das Kind am 26. März aus der klinischen Behandlung als geheilt entlassen werden konnte. Eine Entzündung des Auges stellte sich auch in der Folge nicht wieder ein, obwohl vom 25. März ab sich ständig wieder reichlich Einschlüsse fanden, die weitere 14 Tage lang bis zum 8. April bei regelmäßiger Abnahme an jedem 2. Tag nachgewiesen werden konnten. Aus äußeren Gründen konnten die Untersuchungen dann leider nicht fortgesetzt werden. Auffallend ist hier, daß die Körperchen so lange nach der Heilung in reichlicher Anzahl sich finden ließen, ohne daß das Auge auch nur die geringste Entzündung zeigte.

Von diesem Kinde H. L. wurden nun am 12. März, also an einem Tage, wo die Untersuchung auf Chlamydozoen positiv war, zwei Affen, die Cercopitheken I und II, geimpft. Da es nicht anging, die Affen mit nach Berlin in die Klinik zu nehmen, wurde das Material zur Impfung nach einem leichten Schaben der Conjunctiva mittels Spatels in Kapillarröhrchen von der Bindehaut aufgesaugt und eine Stunde später auf die leicht geritzte Conjunctiva der Affen verrieben. Das mikroskopisch untersuchte Abnahmematerial enthielt Chlamydozoen. Die in diesen beiden Fällen erst am 8. Tage einsetzende mikroskopische Untersuchung der Conjunctivalzellen der geimpften Affen war negativ und blieb es für die Folge. In der ersten Woche war auch klinisch an den Augen nichts zu finden; dann trat langsam eine Rötung und leichte Schwellung der Lider ohne jede Sekretion auf. Am 30. März zeigten sich bei beiden Affen feine Körnchen in der Übergangsfalte und auf den Schleimhautüberzügen der Tränenkarunkel, die nach Bestätigung des Augenarztes Herrn Stabsarzt Collin am 2. April Ähnlichkeit mit Trachom hatten. In gleicher Weise äußerte sich am 4. April Herr Dr. Halberstädter darüber. — Beiden Herren gegenüber fühle ich mich zu Dank verpflichtet für ihr liebenswürdiges Entgegenkommen. — Am 7. April war der klinische Befund, wie folgt: Cercopithecus I zeigt am linken Auge an der unteren Conjunctiva im inneren Augenwinkel und an der oberen Conjunctiva im äußeren Augenwinkel je drei Körnchen; am rechten Auge an der unteren Conjunctiva im äußeren Winkel eine wulstförmige Erhebung, die aus mehreren großen Follikeln zusammengesetzt ist und deren Schwellung stärker ist als beim menschlichen Trachom; das obere rechte Augenlid war normal.

Cercopithecus II zeigte am linken oberen Augenlid an der Übergangsfalte vier große Körnchen. Bei beiden Augen bestand eitrige Sekretion und Verklebung der Lider.

Nach Anfertigung von Ausstrichen wurden bei Cercopithecus I die Erhebung am rechten unteren Lid und bei Cercopithecus II die linke obere Übergangsfalte herausgeschnitten zur Konservierung und Schnittuntersuchung. — Die vernähten Wunden heilten bei beiden Affen ohne weitere Reaktion. — Gleichzeitig wurden mit dem Augensekret vom Cercopithecus II weitergeimpft dieser Affe selbst in die eigene Harnröhre, der Makakus I am linken Auge und in die Scheide, beides nach leichter Reizung der Schleimhäute mittels Skalpells, und vom Cercopithecus I der Makakus II an beiden Augen und in die Harnröhre; ferner wurden je ein großes und ein kleines Kaninchen an beiden Augen mit dem Sekret von beiden Affen geimpft. Diese Tiere wurden jeden 2. bis 3. Tag bis zum 23. Mai, also länger als sechs Wochen, unter-

sucht, stets mit negativem klinischem und mikroskopischem Befund. Aber auch die Untersuchung des am 7. April von den Affen entnommenen Materials war sowohl im Ausstrich als im Schnitt negativ. Die Affen Cercopithecus I und II standen nach der Operation weiterhin bis Ende Juni in Beobachtung; die Körnchen verschwanden allmählich, anfangs Juni hatten die Conjunctiven wieder ein normales Aussehen. Die wöchentlich zweimal unternommene Durchsicht der abgeschabten Zellen auf Chlamydozoen war ergebnislos.

2. Am 18. März wurde mir durch die Liebenswürdigkeit von Herrn Professor Helbron eine Trachomerkrankung zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um die 23jährige B. K., die, aus Schlesien nach Berlin zugezogen, seit dem 3. März an beiden Augen trachomatös erkrankt und bisher nicht in Behandlung gewesen war. Am 19. März wies das Sekret sehr viel Einschlüsse und freie Körner auf. Mit dem wie im Fall 1 gewonnenen Saugserum wurde der Makakus III am linken Auge nach leichter Skarifizierung geimpft. Am 21. März wurden mit dem Saugserum und dem ausgequetschten Follikelmaterial abermals zwei Affen, der Makake IV und der Pavian V, geimpft. Am 30. März zeigten die beiden zuletzt geimpften Affen an den geimpften Augen neben Rötung und Schwellung feine Körnchen. Am 7. April wurde folgender Befund festgestellt: Der Makake III hat in der Mitte der rechten oberen Übergangsfalte 3 Körnchen, der Makake IV zeigt in der linken unteren Übergangsfalte etwas links von der Mitte ein kleineres Körnchen; der Pavian V hat am linken oberen Augenlid 6, am rechten oberen Augenlid 2 kleine Körnchen.

Von dem Pavian V wurden ein großes und ein kleines Kaninchen weitergeimpft.

Von den 3 Affen wurden vom 3. Tage nach der Impfung an bis zum 23. Mai jeden 3. Tag mikroskopische Präparate angefertigt und dann noch 4 Wochen lang von jedem Tier in jeder Woche je ein Präparat; ebenso von den Kaninchen. Der Befund war stets negativ in Bezug auf Chlamydozoen bei allen Tieren. Ende Juni zeigten die Augen der Affen wieder normales Aussehen.

3. Ebenso negativ in bezug auf Chlamydozoen verlief eine zweite Trachomimpfung. Mitte Oktober 1910 erkrankte der Kadett P. aus der Lichterfelder Kadettenanstalt an einer trachomähnlichen Augenentzündung, die dann von dem ihn behandelnden Augenarzt Stabsarzt Collin als Trachom diagnostiziert wurde. Die Untersuchung der Ausstriche auf Einschlüsse war stets negativ, bis sich am 27. Oktober in einem Ausstrich Körnchenanhäufungen in einigen wenigen Zellen fanden, die große Ähnlichkeit mit Einschlüssen zeigten, ohne daß jedoch der Befund mit Sicherheit als solcher angesprochen werden konnte. Am 28. Oktober wurde der Kadett als Trachomkranker operiert. Es wurden nun am 28. Oktober zwei Affen, die Paviane VI und VII geimpft und zwar Pavian VI mit abgeschabtem Conjunctivamaterial und Saugserum, das vor der Operation entnommen war, und der zweite mit dem ausgequetschten Follikelmaterial und ebenfalls Saugserum, das in diesem Fall natürlich sehr viel Blut enthielt. Nach der Operation trat bei dem Kadetten völlige Heilung ein. Bei den Affen zeigte sich vom 4. Tag ab eine leichte Rötung und Schwellung der Conjunctiven, die langsam ständig zunahmen, so daß die oberen Augenlider nach 14 Tagen in starker Schwellung den Augapfel zur Hälfte bedeckten. Dabei bestand geringe eitrige Sekretion, leichte

Verklebung der Lider am Morgen. Eine dem Froschlaich ähnliche Follikelanschwellung konnte nicht festgestellt werden. Diese Erscheinungen hielten bis Ende November an, worauf die Conjunctiva allmählich zur Norm sich zurückbildete. Mitte Dezember trat plötzlich wieder starke Rötung und Schwellung ein; — seit dem 28. November waren keine Ausstriche mehr von den Conjunctiven angefertigt worden, so daß in einer dadurch verursachten Verletzung oder Infektion die Ursache hierfür nicht gefunden werden kann. Bei beiden Affen zeigten sich an beiden oberen Conjunctiven sulzige Anschwellungen, die Ende Dezember eine derartige Stärke erreichten, daß die Tiere nur mit größter Mühe die Lider bewegen konnten. Beide Affen wiesen an den oberen Conjunctiven Anfang Januar 1911 starke narbige Einziehungen auf, die sich am freien Rand der Conjunctiva zu direkten Einschnitten ausbildeten. Der Pavian VI starb ohne sichtbare Krankheit am 9. Januar, der Pavian VII am 13. Januar 1911. Die Sektion hatte ein negatives Ergebnis, insbesondere waren beide Tiere frei von Tuberkulose. — Vom 3. Tage nach der Impfung, 31. Oktober, wurden bis zum 28. November jeden 3. Tag, und vom 20. Dezember bis zum Tode jeden 4. Tag Conjunctivaausstriche angefertigt; Einschlüsse wurden weder in ihnen noch in den nach dem Tode angefertigten Schnittpräparaten der Conjunctiva gefunden.

4. Zum Schluß möchte ich nicht unerwähnt lassen einen Fall aus der Privatpraxis. Im April 1911 wurde ich zu einer Entbindung gerufen. Der Kopf des Kindes wurde über den Damm vom Darm aus entwickelt. Dem Kinde wurden unmittelbar nach der Geburt einige Tropfen einer frisch bereiteten 1-proz. Höllensteinlösung in die Augen geträufelt. Ich lege Gewicht darauf zu betonen, daß beide Eltern, völlig gesund, nicht gonorrhöekrank gewesen sind; die Untersuchung der Vagina auf Gonokokken war negativ. Am ersten Tage nach der Geburt war die Rötung der Conjunctiven beim Neugeborenen normal; sie nahm jedoch am 2. und 3. Tag stark zu, zugleich trat eine heftige Schwellung der Lider ein mit geringer Eiterung, so daß ich mich entschloß, einige Ausstrichpräparate anzufertigen und Kulturen auf Agar-, Blutagar-, Löffler-Serumplatten und in Bouillon anzulegen. Die Kulturen blieben völlig steril, auch in den Ausstrichpräparaten ließen sich keine Bakterien finden trotz reichlicher Anzahl von Leukozyten, wohl aber eine große Anzahl völlig charakteristischer Chlamydozoen. In diesem Fall waren also bereits 3×24 Stunden nach der Geburt die Einschlüsse in großer Menge nachweisbar. Ein zweites, am 9. Tag angefertigtes Ausstrichpräparat zeigte wieder eine äußerst große Menge von Einschlüssen, jedoch keine Bakterien. Da vom 10. Tage ab die Hornhaut mit in Affektion gezogen wurde und zwar auf beiden Augen, verzichtete ich in Zukunft wegen der für die Cornea damit verbundenen Gefahr darauf, weitere Ausstrichpräparate zu machen, und unterließ aus diesem Grunde auch die in Aussicht genommene Weiterimpfung auf Affen.

Die Behandlung der Augen bestand im Anfang in Einreibung von Borvaselin, nach Entzündung der Cornea in Auswaschung mit Borsäurelösung und Einträufelung von kleinen Dosen Atropin (0,05 : 10,0, einen Tropfen jeden dritten Tag). Als nach drei Wochen keine Besserung eintrat, wurde ein Spezialarzt zu Rate gezogen. Auch auf ihn machte die Entzündung den Eindruck einer „schwer trachomatösen Erkrankung".

Die Weiterbehandlung bestand nur in Auswaschung mit Borsäurelösung zweimal täglich. Nach 4 Wochen trat langsame Besserung ein, nach 6 Wochen öffnete das Kind von selbst zum ersten Mal die Lider, nach weiteren drei Wochen waren sämtliche Entzündungserscheinungen zurückgegangen; Einschlüsse waren jetzt nicht mehr nachzuweisen. In der rechten oberen inneren Conjunctiva ist eine feine narbige Einziehung entstanden von etwa $^3/_4$ cm Länge, die eine geringe Deformation am Lidrand erzeugt, an der linken oberen inneren Conjunctiva ebenfalls eine feine Narbe von etwa $^1/_4$ cm Länge, ohne Deformation zu verursachen. An der rechten Cornea besteht nach $^1/_2$ Jahr noch eine feine Macula in der unteren Hälfte der Pupille. Die linke Cornea ist überall klar.

Hier lag also eine schwere Augenentzündung bei einem Neugeborenen vor, die unter heftigen trachomähnlichen Krankheitserscheinungen verlief; die Ausstriche von 3×24 Stunden nach der Geburt wiesen eine große Menge von Chlamydozoen auf. Die wiederholte Untersuchung der Vagina auf Gonokokken war negativ, ebenso blieben die erwähnten verschiedenen Kulturimpfungen aus den Augen steril, die schweren Entzündungen waren nach 9 Wochen auf reine Behandlung mit Borsäure mit Hinterlassung von Narben und einer Macula abgeheilt, die Einschlüsse verschwunden.

Bei kritischer Betrachtung dieses Falles scheinen mir zwei Punkte von Bedeutung zu sein: Die Entwicklung des Kindskopfes vom Darm aus und die Einträufelung der frischen Höllensteinlösung. Die Lage des Kopfes bei der Geburt war eine linke vordere Hinterhauptslage, wegen eintretender Wehenschwäche erfolgte Entwicklung des Kopfes vom Darm. Dabei kann sehr leicht ein starker Druck auf die Augen ausgeübt worden sei. Die feinen, jeden Reizes ungewohnten Gewebe des Auges antworteten hierauf mit einer Entzündung, die dann noch durch Einträufelung der frischen Höllensteinlösung wesentlich verstärkt wurde. Offen bleibt die Frage, wie die Zelleinschlüsse entstanden sind. Auf einige allgemeine Gründe, die gegen ihre Natur als Zelldegenerationen und für ihre Natur als Mikroorganismen sprechen, werde ich später noch zurückkommen. In dem vorliegenden Fall, bei dem weder durch die angelegten Kulturen noch in den mikroskopischen Präparaten sich irgendwelche Bakterien nachweisen ließen, glaube ich sie aus eben diesem Grunde als selbständige Parasiten ansprechen zu dürfen, die ihrerseits die vielleicht vorbereitete Entzündung der Conjunctiva zu einer so hartnäckigen, selbst die Cornea gefährdenden machten. Ich bin nicht der Ansicht, daß die Befunde der übrigen Forscher zu der Annahme zwingen, daß man in den Einschlüssen Parasiten vor sich hat, die zum mindesten nicht selbständig, ohne Mitwirkung anderer Mikroorganismen eine Infektion hervorrufen können (Flemming); dafür steht noch jeder Beweis aus.

Im Frühjahr 1910 wurde mir von Herrn Geheimrat Uhlenhuth, der bereits seit mehreren Jahren an der Erforschung der Schweinepest arbeitete, die histologisch-pathologische Untersuchung der an Pest erkrankten Schweine übertragen. Die Tiere zeigen im Beginn der Erkrankung unter anderen Erscheinungen sehr häufig eine ödematöse Schwellung der Augenlieder mit eitriger Sekretion bis zur völligen Verklebung der Augen. Bei der Untersuchung der Conjunctivalzellen fand ich Chlamydozoen, die die größte Ähnlichkeit mit den bei Trachom und Blennorrhöen vorkom-

menden Körperchen zeigten. In der Sitzung der Hufelandischen Gesellschaft vom 14. Juli 1910[1]) ist von mir über die Befunde in Kürze berichtet worden. Dabei wurden bereits Übertragungsversuche mit solchem Material auf Affen, Kaninchen und Meerschweinchen erwähnt. Die ersten Chlamydozoen fand ich beim Schwein nach Überimpfung von Auge zu Auge in einigen Fällen bereits 3×24 Stunden nach der Impfung. Die Vergleichsuntersuchungen der Schweinepestkörperchen und der Trachomkörperchen ergaben nun als Unterschied, daß die Körnchen in den Conjunctivalzellen der Schweine niemals die Feinheit erreichten wie beim Trachom, so daß ich nach einiger Übung sowohl am mikroskopischen Präparat wie auch an der photographischen Platte da, wo die Einschlüsse reichlich vorhanden waren, erkennen konnte, welche Erkrankung vorlag. Schon dies schien mir damals dagegen zu sprechen, daß man es mit einer Zelldegeneration zu tun habe, da ich mir nicht erklären konnte, warum bei der einen Erkrankung die Zelle stets mit regelmäßiger Sicherheit eine grobkörnige, bei der anderen eine feinkörnige Degeneration erleiden sollte.

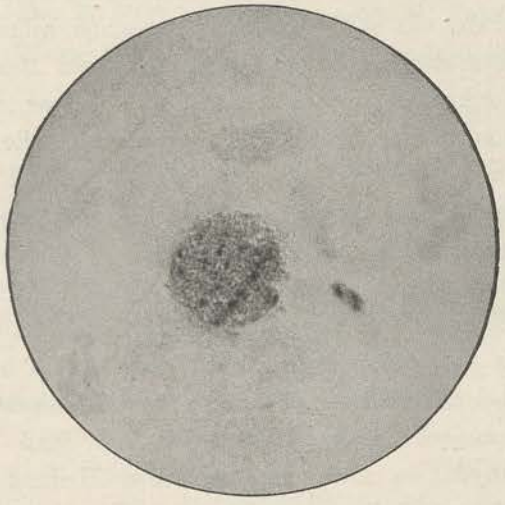
Bei den Schweinepestkörperchen habe ich oft im Protoplasma der Zelle, weitab vom Kern, kreisrunde, scheinbar in sich abgeschlossene Gebilde gefunden, bestehend aus lauter dicht aneinander gedrängt liegenden Körnchen ohne jedes Plastin, die sich mit Giemsas Farblösung zum Teil rot, zum Teil blau färbten; Gebilde, die so groß sein konnten, daß sie die ganze Zelle prall ausfüllten.

Halberstädter und v. Prowazek geben in ihrer ersten Veröffentlichung über die Trachomkörperchen an, daß bei den Einschlüssen sich das Plastin mit Giemsas Farblösung blau, die Körnchen dagegen rot färben. Die meisten Nachuntersucher sprechen sich nun dahin aus, daß die Körnchen sich nicht einheitlich färben, sondern bald rot, bald blau erscheinen. Auch ich machte dieselbe Erfahrung; rote und blaue Körnchen waren in den frisch gefärbten Präparaten dicht nebeneinander gelagert. Bei kürzlicher Durchsicht meiner nun zum Teil $1\frac{1}{2}$ Jahre alten in Zedernholzöl eingebetteten Präparate fiel mir auf, daß sämtliche blauen Körnchen der Einschlüsse verschwunden und nur noch rote übrig waren. Meine erste Annahme, daß die Farbe der blauen Körnchen allmählich verblichen sei und dadurch die blauen Körnchen selbst unsichtbar geworden seien, erwies sich nach Fertigstellung von neuen Photogrammen derselben Einschlüsse beim Vergleich der Platten als irrig; an Stelle der vorher blauen Körnchen lagen jetzt rote. Ich komme daher zu der Ansicht, daß die Farblösung von Giemsa für die feinen Körnchen nicht einheitlich genug färbt; es besteht aber auch die Möglichkeit, daß an einem Teil der Körnchen noch mehr oder weniger Plastin haftet und durch dies blaugefärbte anhaftende Plastin das eigentliche Körnchen verdeckt wird. Bei meiner nachher zu besprechenden Färbung mit Azur ist ein Farbenunterschied der Körnchen nicht festzustellen.

Untersucht wurden sowohl Trockenausstriche wie feucht fixierte und gefärbte Präparate. Erstere kamen nach dem Trocknen auf 10 Minuten in absoluten Alkohol und wurden nach Giemsa gefärbt: — 2 Stunden Schichtseite nach unten in eine

[1]) Uhlenhuth und Böing, Chlamydozoenbefunde bei Schweinepest. Berl. Klin. Woch. 1910, S. 1514.

Lösung von 5—8 Tropfen Giemsa auf 10 ccm Aqua destillata; diesem Gemisch kann ein Tropfen einer stark verdünnten Essigsäure: 1 Tropfen Eisessig auf 100 ccm Aqua destillata zugesetzt werden. Nach der Färbung erfolgt sofortiges Abspülen in Leitungswasser ohne vorherige Differenzierung. — Die feucht fixierten Präparate wurden wie folgt behandelt: die noch feuchten Ausstriche kommen mit der Schichtseite nach unten in eine heiße Alkohol-Sublimatlösung (Subl. $^2/_3$, Alc. abs. $^1/_3$) auf eine halbe Stunde, dann 1 Minute in Aqua destillata, eine halbe bis 1 Stunde in 60% hellbordeauxroten Jodalkohol, 1 Stunde in 60% Alkohol, dann kurz in 40% Alkohol, Aqua destillata und zum Schluß in die gleiche Farbmischung wie vorher. Nach vorsichtigem Abspülen in Wasser werden die Präparate sofort durch Azeton, Azeton-Xylol in reines Xylol gebracht und in Zedernholzöl eingebettet. Um ein Verharzen des Öles zu verhindern, lege ich um das Deckgläschen noch eine dünne Schicht eingedickten Kanadabalsams. Neben der Giemsafärbung hat sich eine andere Art der



Färbung für Trockenausstriche gut bewährt. Die in Alkohol fixierten Präparate werden in der angegebenen Giemsalösung 10—15 Minuten lang vorgefärbt, kurz mit Alcohol absol. differenziert und stark mit Leitungswasser abgespült. Dann wird auf den Objektträger, Schichtseite nach oben, eine alkoholische Azur I-Lösung gegossen, mit der man die Objektträger eine halbe Stunde stehen läßt. Die Farblösung wird hierauf abgegossen; es tritt nun durch vorsichtiges Blasen auf den Objektträger ein Umschlagen des rein blauen Tones der noch anhaftenden Azurlösung in einen schwach rötlich violetten Ton ein. Jetzt wird das Präparat in fließendem Wasser abgespült und zum Trocknen aufgestellt. Die Einschlüsse zeigen einen blaugrünen Ton, die Körnchen sind feiner und treten schärfer hervor als bei der Giemsafärbung, die Initialstadien sind leuchtend blau, die Kerne der Zellen schwach rosa gefärbt. Behandelt man ein so gefärbtes Präparat weiterhin unter mikroskopischer Kontrolle mit Salzsäurealkohol, so halten die Einschlußkörnchen am zähesten die Farbe fest; es läßt sich leicht soweit differenzieren, daß Plasma und Kern der Zelle völlig farblos sind, und nur die Körnchen gefärbt übrig bleiben (siehe Photogr.: Öl. Im. 2,0, Oc. 4).

Es liegt also eine gewisse Salzsäurefestigkeit vor, und da es meines Wissens bisher nicht beobachtet ist, daß bei einer Zelldegeneration neue Bestandteile vom Plasma oder vom Kern der Zelle gebildet werden können, die eine derartige Salzsäurefestigkeit haben, so halte ich diese für einen weiteren Beweis dafür, daß die Trachomkörperchen keine Zelldegeneration sind.

Wenn Flemming in seiner Arbeit „Klinischer Verlauf desquamierender Katarrhe der Conjunctiva bei Trachomkörperchenbefund" sagt, daß die Trachomkörper stets nur in pathologisch veränderten Zellen vorkommen, so kann ich diesen Befund nicht bestätigen. Zur Beurteilung, ob eine Zelle normal oder pathologisch verändert ist, darf man meines Erachtens Trockenausstriche überhaupt nicht benutzen; es kann zu leicht durch das Ausstreichen und vor allem durch die Austrocknung zu Veränderungen der Zelle kommen, die man dann als pathologisch anzusehen geneigt sein könnte. In den feucht fixierten Präparaten findet man jedenfalls häufig Zellen mit Einschlüssen, die, wenn die Einschlüsse noch klein sind, so daß sie an Größe $^1/_4$ bis $^1/_3$ der Korngröße nicht überschreiten, ein völlig normales Aussehen zeigen; weder Kern noch Protoplasma lassen trotz stärkster Vergrößerung in ihrem Bau oder in ihrer Färbbarkeit irgend etwas erkennen, was als pathologisch angesprochen werden müßte. Leider versagte die Untersuchung frischer Deckglaspräparate, die ich zur Beantwortung dieser Frage unternahm, völlig, weil ich dabei, ebenso wie bei der Untersuchung im Dunkelfeld, mit Sicherheit Zelldegenerationen, Trachomkörperchen und sonstige körnigen Zelleinschlüsse zu unterscheiden nicht imstande war.

Zum Schluß sei kurz zusammengefaßt, daß bezüglich der Befunde in menschlichen Conjunctivalzellen unsere Beobachtungen übereinstimmen mit denen der andern Autoren; ich fand die Einschlüsse sowohl bei Trachom wie bei anderen Conjunctivitiden; hier speziell bei Säuglingen und zwar unter 86 Fällen 11 mal, darunter ein Fall einer Gonokokkenmischinfektion. Auch ich sah, daß bei der Blennorrhoea neonatorum die Chlamydozoen nach der klinischen Heilung noch lange in den Epithelzellen der Bindehaut fortbestehen können. Neu ist wohl die Beobachtung ihres Vorkommens bei einer trachomähnlichen Augenentzündung des Säuglings ohne jeden bakteriellen Befund. Über die Frage, ob wir in ihnen den Erreger des Trachoms vor uns haben, und in welcher Beziehung die Einschlußblennorrhöen zum Trachom stehen, läßt sich nach unseren Befunden kein endgültiges Urteil fällen; dieser Frage näherzutreten, kann vorläufig wohl nur durch sehr zahlreiche Untersuchungen in trachomverseuchten Gegenden versucht werden. Bezüglich der Befunde an den Affen scheint es von Interesse zu sein, daß ich bei mehreren Affen, die teils mit Trachom-, teils mit Blennorrhöe-Material geimpft waren, im Verfolg der Impfung die gleichen Erscheinungen feststellen konnte, Erscheinungen, die in allen Fällen in ihrer deutlichen einwandfreien Körnchenbildung klinisch dem Trachom ähnlich waren, daß es mir aber abweichend von den Mitteilungen anderer Forscher niemals gelang, trotz häufig wiederholter Untersuchung der sieben geimpften Affen auch nur einmal Chlamydozoen zu finden.

Ende des 2. Heftes.
Abgeschlossen am 29. Mai 1912.

Über verbesserte Herstellung von Milchseren und ihre Anwendbarkeit zur Untersuchung der Milch.

Von

Dr. B. Pfyl und **Dr. R. Turnau,**

wissenschaftlichen Hilfsarbeitern im Kaiserlichen Gesundheitsamte.

Übersicht: 1. Einleitung. — 2. Herstellung der verbesserten Seren (Tetraserum I u. II.) — 3. Eigenschaften der Tetraseren im Vergleich zu andern Milchseren. — Durchsichtigkeit. — Fettgehalt. — Verhalten beim Erhitzen. — Peroxydasengehalt. — Mineralstoffgehalt. — Stickstoffverbindungen. — Lichtbrechung. — Spez. Gewicht. — Einfluß der selbsttätigen Änderung der Milch. — Einfluß der Melkart, Melkzeit, Fütterung, Laktationszeit usf. — Einfluß der Erhitzung. — Einfluß von Zusätzen. — 4. Anwendbarkeit der Tetraseren im Vergleich zu andern Seren. — Prüfung auf Milchwässerung. — Nachweis von Nitraten, Nitriten, Ammoniak. — Prüfung auf Milcherhitzung. — Prüfung auf abnorme Milch. — Bestimmung von Albumin und Globulin. — Bestimmung von Milchzucker. — Prüfung auf Zusätze. — Sonstige Anwendungen. — 5. Zusammenfassung.

I. Einleitung.

Für die Untersuchung der Milch werden in steigendem Maße solche aus der Milch hergestellte Flüssigkeiten angewendet, denen gewisse die Analyse störende Milchbestandteile entzogen sind. Diese Flüssigkeiten werden in der Regel als „Serum" bezeichnet, obwohl man unter Milchserum im physiologisch-chemischen Sinne nur die von den aufgeschwemmten oder emulgierten Stoffen abgetrennte, klare Milchflüssigkeit zu verstehen hätte. Ein derartiges Milchserum ließe sich voraussichtlich durch Filtration der Milch mittels Tonzellen, tierischer Membranen, Gelatine- oder Kollodiumfilter erhalten; hierbei müßte aber ein Verlust an Kohlendioxyd und die damit im Zusammenhang stehende Abscheidung von Carbonaten durch Anwendung eines Überdruckes von Kohlendioxydgas verhindert werden. Versuche dieser Art sind im chemischen Laboratorium des Kaiserl. Gesundheitsamtes von Dr. J. Meyer unter anderem auch mit dem Bechholdschen Ultrafiltrationsapparat ausgeführt worden. Es zeigte sich aber, daß eine solche Filtration nicht ohne praktische Schwierigkeiten durchführbar ist und daß je nach der Dichte der Filter nicht nur Kasein, sondern auch gerinnbares Eiweiß (Albumin und Globulin) zurückgehalten wird.

Die sonstigen für die Untersuchung der Milch vorgeschlagenen Milchflüssigkeiten werden durch chemische Eingriffe oder nach natürlichen Veränderungen der Milch hergestellt und würden daher den Namen „Serum", streng genommen, nicht mehr verdienen. Doch sind die Bezeichnungen: Spontanserum, Labserum, Essigsäureserum, Chlorcalciumserum, Asaprolserum, Bleiserum allgemein gebräuchlich.

Unter diesen Seren haben wohl die Essigsäureseren bis in die neueste Zeit hinein am meisten Beachtung gefunden, die sie auch wegen ihrer vielseitigen Verwendbarkeit verdienen. Die Herstellung von Milchseren durch Essigsäure beruht der Hauptsache nach auf der Ausfällung des Kaseins durch den Säurezusatz, wobei gleichzeitig das Milchfett zum größten Teil mitgerissen wird.

Die Beschaffenheit und chemische Zusammensetzung der hiernach erhaltenen Seren ist von den näheren Bedingungen der Herstellung in hohem Maße abhängig. Die einzelnen Analytiker haben jeweils für besondere Zwecke besondere Vorschriften zur Herstellung der Seren gegeben. Waren diese Anweisungen nicht genau umschrieben, so wurden von anderer Seite abweichende Ergebnisse erhalten. So kommt es, daß eine große Zahl verschiedener Essigsäureseren der Milch beschrieben worden ist, die jeweils nur beschränkte Anwendung fanden.

Eine vergleichende Prüfung der Herstellungsvorschriften dieser Seren läßt erkennen, daß hiernach im allgemeinen Seren erhalten werden, die der Hauptsache nach von Fett und Kasein befreit sind, daß sie aber das gerinnbare Eiweiß zum Teil noch vollständig, zum Teil gar nicht mehr, z. T. in unbestimmter Menge enthalten. Wenn auch von einzelnen Seiten darauf hingewiesen wurde, daß die Seren je nach Erwärmungstemperatur und -dauer mehr oder weniger gerinnbares Eiweiß enthalten, so wurde im allgemeinen zwischen diesen 3 Gruppen von Seren nicht unterschieden. Infolgedessen wurden mit den Essigsäureseren vielfach ungünstige Erfahrungen gemacht, so daß die an sich sehr zweckmäßige Herstellung von Milchseren mittels Essigsäure durch andere, mit tiefern Eingriffen verbundene Gewinnungsarten analytisch mehr oder weniger brauchbarer Milchflüssigkeiten zum Teil verdrängt wurde. Diese Seren haben sich um so leichter in die Praxis eingeführt, je klarer und je rascher sie herstellbar waren.

Es ist uns nun gelungen, die Gewinnung der Essigsäureseren aus Milch so zu vereinfachen, zu verbessern und in den Bedingungen festzulegen, daß danach mit Leichtigkeit aus jeder frischen oder älteren Milch zwei unter sich nur durch die An- oder Abwesenheit des Gesamtalbumins und -Globulins verschiedene, sonst aber streng vergleichbare und stets gleichmäßig ausfallende Seren bereitet werden können, die klar und fettfrei sind, ein äußerst vielseitiges Anwendungsgebiet für die Milchuntersuchung besitzen und die Herstellung anderer Seren entbehrlich machen.

Im folgenden soll zunächst die Vorschrift zur Herstellung der neuen Seren gegeben werden, wie sie von uns nach Durchsicht der gesamten umfangreichen Literatur auf Grund kritischer Überlegungen, zahlreicher Vorversuche und analytischer Untersuchungen ausgearbeitet worden ist.

2. Herstellung der neuen Essigsäureseren.

Albumin- und globulinhaltiges Serum.

(Tetrachlorkohlenstoff-Essigsäureserum I oder kurz: **Tetraserum I.**)

„50 ccm Milch werden mit etwa 5 ccm Tetrachlorkohlenstoff in einer Stöpselflasche 5—10 Minuten gut durchgeschüttelt, mit 1 ccm einer 20%igen Essigsäure versetzt, nochmals einige Minuten geschüttelt und zentrifugiert."

Die über dem zusammenhängenden Kuchen sich abscheidende Flüssigkeit ist klar und braucht nur für die pyknometrische Bestimmung des spezifischen Gewichtes und für die Messung der Polarisation gegebenenfalls von etwa losgelösten Fetzchen filtriert zu werden.

Wo eine Zentrifuge nicht zur Verfügung steht, kann das Koagulum auch durch Filtrieren abgetrennt werden, was rasch und ohne Schwierigkeiten von statten geht.

Bei Kolostrum oder bei Milch kranker Tiere kann es erforderlich werden, die doppelte Menge Essigsäure anzuwenden. Bei der Verwendung derartiger Seren zur Messung der Lichtbrechung ist der vermehrte Essigsäurezusatz durch Abzug von 0,2 Refraktometergraden zu berücksichtigen.

Der Tetrachlorkohlenstoff muß rein sein. Insbesondere darf er bei längerem Schütteln mit Wasser und nachfolgendem Zentrifugieren oder Filtrieren die Lichtbrechung des Wassers höchstens um 0,2 Refraktometergrade ändern.

Von gerinnbarem Eiweiß freies Serum.

(Tetrachlorkohlenstoff-Essigsäureserum II oder kurz: **Tetraserum II.**)

„Die Milch wird 20 Minuten lang in einem Glaskolben mit Rückflußrohr in kochendem Wasserbade erwärmt. Nach dem Erkalten wird das im Kühlrohr befindliche Kondenswasser mit der Milch im Kolben heruntergespült. 50 ccm der Flüssigkeit werden sodann in gleicher Weise wie zur Herstellung des Tetraserums I behandelt."

Begründung:

Bei der Herstellung der neuen Seren war zunächst die Erwägung maßgebend, daß diejenigen Seren, welche eine unkontrollierbare Menge Eiweiß enthalten, für Untersuchungszwecke überhaupt nicht in Frage kommen können, daß dagegen einerseits ein nach einem einheitlichen Verfahren hergestelltes Serum, welches alle analytisch feststellbaren albumin- und globulinartigen Stoffe noch enthält, anderseits ein mit diesem Serum vergleichbares, von gerinnbarem Eiweiß freies Serum für Untersuchungszwecke von großer Wichtigkeit sei, wenn es gelänge, diese zwei Seren den Bedürfnissen der Praxis entsprechend rasch und bequem herzustellen.

Die Beibehaltung der Essigsäure zur Abscheidung von Kasein erschien uns zweckmäßig, weil anzunehmen war, daß verdünnte Essigsäure im Überschuß zugesetzt einerseits als sehr schwache Säure Kasein nicht als Acetat löst, anderseits aber alle in Milch außer Fett und Kasein vorkommenden Stoffe in Lösung hält.

Zur Bestätigung der ersten Annahme haben wir einen durch Zusatz von 1 ccm 20%iger Essigsäure und Tetrachlorkohlenstoff abgeschiedenen Fett-Kaseinkuchen, der

von Tetrachlorkohlenstoff und sonstigen Beimengungen durch Behandeln mit Wasser, Filtrieren und Zentrifugieren gereinigt war, mit einem Gemisch von 50 ccm Wasser und 1 ccm 20%iger Essigsäure 10 Minuten lang geschüttelt und dann wieder zentrifugiert. Die Refraktion der Flüssigkeit blieb vor und nach dem Schütteln dieselbe. In 25 ccm der mit dem Kuchen geschüttelten Säure wurden ferner nach Kjeldahl auch nicht Spuren von Stickstoff gefunden.

Daß anderseits alle Mineralstoffe gelöst bleiben, ergeben folgende Versuche:

53,35 ccm Milch, entsprechend 50 ccm Serum, wurden mit 1 ccm 20%iger Essigsäure und 5 cm Tetrachlorkohlenstoff geschüttelt und zentrifugiert. 25,5 ccm des abpipettierten Serums ergaben 0,035 g CaO[1]). Der Rest des Serums zusammen mit dem Kaseinkuchen enthielt dieselbe Calciummenge, 0,036 g CaO[1]).

Durch Essigsäure werden allerdings die in Milch enthaltenen Kaseinate und Carbonate, letztere unter Verlust von Kohlendioxyd, in Acetate überführt und allenfalls ungelöste Calciumphosphate und -Citrate, womit jedoch nur in erhitzter Milch zu rechnen ist, in lösliche Salze umgewandelt. Aber hierin erblicken wir im Gegensatz zu andern Behauptungen (vergl. S. 286) einen Vorteil der Essigsäureseren, weil die hierdurch gelösten Salze zu den Bestandteilen der „fett- und kaseinfreien Trockenmasse" gehören, die nach Cornalba[2]) unter allen analytischen Werten der Milch die kleinsten Schwankungen zeigt. Demgegenüber werden bei Anwendung von Chlorcalcium als Abscheidungsmittel der Eiweißstoffe die Carbonate, Phosphate, Citrate und der Kaseinkalk der Milch zum Teil ausgefällt und dadurch der Mineralstoffgehalt des Milchserums und weiterhin die „fett- und kaseinfreie Trockenmasse" je nach der Acidität der Milch mehr oder weniger verändert. Die Menge der hierbei nicht gelösten oder abgeschiedenen Salze ist, wie nachfolgender Versuch zeigt, nicht unerheblich:

60 ccm Milch, entsprechend 57,2 ccm Serum, wurden nach Ackermann mit Chlorcalcium versetzt und im Wasserbade erhitzt; 28,6 ccm des abgegossenen Serums enthielten 0,026 g CaO[1]), die andere Hälfte mit dem Niederschlag zusammen verascht, ergab dagegen bedeutend mehr Kalk: 0,187 g CaO[1]).

War somit die Zweckmäßigkeit der Essigsäure als Ausfällungsmittel erwiesen, so handelte es sich weiter um die anzuwendende Menge.

Das allgemein übliche Verhältnis von 1 ccm 20%iger Essigsäure auf 50 ccm Milch ist in den meisten Fällen das geeignete. Nur bei Kolostrum, das mehr Kaseinkalk enthält, und bei Milch kranker Tiere, die oft alkalisch reagiert, ist ein größerer Säurezusatz erforderlich und auch in obiger Vorschrift vorgesehen. Dagegen würde es sich nicht empfehlen, allgemein einen höheren Säurezusatz anzuwenden, weil man dadurch die Zusammensetzung und damit die Lichtbrechung und das spezifische Gewicht sowie die sonstige Beschaffenheit des Serums unnötigerweise verändern würde. Ebenso wäre es unzweckmäßig, die gleiche Menge Säure in konzentrierterer Form zuzusetzen, weil dann leicht störende Überschreitungen der erforderlichen Menge vorkommen könnten.

Zur experimentellen Prüfung des Einflusses der Essigsäure auf die Lichtbrechung des Serums haben wir die Lichtbrechung von Wasser, von Milch-

[1]) Mittel aus 2 Versuchen.

[2]) Rev. gén. du Lait 7, 33 u. 56 (1908).

zuckerlösungen verschiedener Konzentration, von verschiedenen Milchseren vor und nach dem Zusatz der üblichsten Mengen von Essigsäure miteinander verglichen.

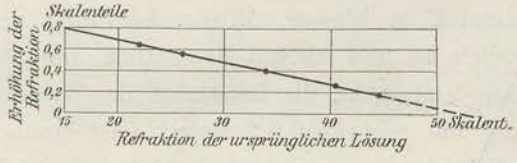
Tabelle 1. Einfluß eines Zusatzes von 20%iger Essigsäure[1]) auf die Lichtbrechung von Lösungen.

R = Skalenteile des Zeißschen Eintauchrefraktometers bei 17,5°.

Lösung	Lichtbrechung vor dem Zusatz der Essigsäure	Lichtbrechung nach Zusatz von 20%iger Essigsäure zu je 50 ccm Lösung		
		0,5 ccm	1 ccm	2 ccm
	R	R	R	R
Wasser	15,0	—	15,8	—
Milchzucker[2])				
1,9 %	22,2	—	22,9	—
2,85 „	25,8	—	26,4	—
4,76 „	33,2	—	33,6	—
6,8 „	40,1	—	40,35	40,5
7,7 „	43,9	—	44,1	44,3
Tetraserum I				
Milch a	42,4	42,5	42,6	—
„ b	44,2	44,3	44,35	—
Spontanserum				
Milch c	42,1	—	42,3	—
„ d	43,1	—	43,35	—

Aus den in Tabelle 1 angeführten Versuchen ergibt sich, daß die Lichtbrechung der gewöhnlichen Milchseren oder einer etwa ebenso stark brechenden Lösung von Milchzucker durch den Zusatz von 1 ccm 20%iger Essigsäure zu 50 ccm Flüssigkeit durchschnittlich um etwa 0,2 Refraktometergrade erhöht wird; diese Erhöhung bleibt auch bei kleinen Veränderungen der Konzentration (z. B. um etwa 1 % Milchzuckergehalt) gleich. Durch besondere Versuche wurde ferner festgestellt, daß die Umwandlung der geringen in der Milch vorkommenden Mengen Carbonate in Acetate ohne Einfluß auf die Lichtbrechung ist.

Fig. 1. Einfluß eines Zusatzes von 2% einer 20%igen Essigsäure auf die Refraktion von Milchzuckerlösungen.



Refraktion von Wasser = 15 Skalenteile
„ „ 20%iger Essigsäure = 53 Skalenteile.

In Verallgemeinerung dieser Ergebnisse und in Berücksichtigung der von Wagner[3]) für die Salzlösungen usf. mitgeteilten Werte der Lichtbrechung läßt sich vorstehende graphische Darstellung (Fig. 1) des Einflusses der Essigsäure geben.

[1]) 20 g Essigsäure in 100 g Lösung von der Refraktion R = 53.
[2]) Wasserfrei, mehrfach umkristallisiert.
[3]) Wagners Tabellen zum Eintauchrefraktometer. 1907. Selbstverlag, Sondershausen.

Weiter folgt aus der Tabelle, daß bei Verdoppelung des üblichen Essigsäurezusatzes, wie er bei physiologisch und pathologisch veränderter Milch in Frage kommen kann, die Refraktion sich um weitere 0,2 Skalenteile erhöht. Hieraus ergibt sich ferner, daß geringe Über- oder Unterschreitungen der vorgeschriebenen Menge Essigsäure — im Gegensatz zum Chlorcalciumzusatz beim Chlorcalciumserum — ohne beachtenswerten Einfluß auf die Lichtbrechung sind.

Eine der Hauptschwierigkeiten, welche der allgemeinen Einführung der Essigsäureseren insbesondere für die Massenkontrolle im Wege stand, war die üble Eigenschaft dieser Seren, trüb und langsam zu filtrieren. Insbesondere waren die albumin- und globulinhaltigen Seren oft kaum klar zu bekommen. Auch die neuerdings von Fendler und Stüber[1]), Burr, Berberich und Lauterwald[2]) verbesserten Seren filtrieren zwar mitunter klar, meistens aber sehr langsam. Gegen langsam filtrierende globulin- und albuminhaltige Seren wurde mit Recht der Einwand erhoben[3]), daß je nach der Dichte des Filters und der Art des Filtrierens verschiedene Mengen von Eiweiß gelöst gehalten werden.

Nachdem wir nun zunächst vergeblich versucht hatten, durch Erwärmen auf geeignete Temperaturen und nachfolgende Eiskühlung, sowie durch Anwendung von verschiedenen Essigsäurekonzentrationen, ferner durch Einleiten von Kohlendioxyd bei gleichzeitiger Kühlung, durch Zentrifugieren, Anwendung von Ausflockungsmitteln usf. klare und sich rasch absetzende Seren zu bekommen, half uns schließlich ein Kunstgriff über diese Schwierigkeiten hinweg.

Als nämlich verschiedene Essigsäureseren zentrifugiert wurden, schied sich zwar das Kasein mehr oder weniger vollständig ab, die Seren waren jedoch immer, insbesondere in den obern Schichten, durch Fettemulsionen getrübt. Wir schüttelten daher vor dem Zusatz der Essigsäure die Milch mit Chloroform oder mit Tetrachlorkohlenstoff, in der Voraussetzung, daß das Fett zum Teil gelöst, zum Teil beim Zentrifugieren mit dem Kasein ausgeschleudert und vom Chloroform oder Tetrachlorkohlenstoff zurückgehalten werde. Die Versuche verliefen nun besonders mit Tetrachlorkohlenstoff nach Wunsch, indem sich das Kasein mit dem Fett in einem festen zusammenhängenden Kuchen abschied und keine Fetttröpfchen mehr an die Oberfläche stiegen. Da Tetrachlorkohlenstoff in Wasser, Milchzuckerlösung und in einem Essigsäureserum praktisch unlöslich ist und hiermit geschüttelt, wie aus den in Tabelle 2 verzeichneten Versuchen hervorgeht, die Refraktion des Wassers oder des Serums und der Milchzuckerlösung um höchstens 0,2 Refraktometergrade, das spezifische Gewicht nur um etwa 0,2 Laktodensimetergrade ändert, so gaben wir diesem den Vorzug.

Es zeigte sich aber weiterhin, daß das Zentrifugieren nach Bedarf auch durch Filtration ersetzt werden kann. Im Gegensatz zu den früheren Essigsäureseren zeigen die bei Gegenwart von Tetrachlorkohlenstoff hergestellten die Eigenschaft, rasch und klar zu filtrieren, ohne daß irgendwie wesentliche Bestandteile vom Filter zurückgehalten werden.

---

[1]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. **20**, 157 (1910).
[2]) Milchw. Zentralbl. **4**, 219 (1908).
[3]) Bialon, Milchw. Zentralbl. **1**, 363 (1905).

Tabelle 2. Einfluß des Tetrachlorkohlenstoffs[1]) auf Lichtbrechung und spezifisches Gewicht von Wasser und wässerigen Lösungen.

R = Skalenteile des Zeißschen Eintauchrefraktometers bei 17,5°.

d_4^{15} = spezifisches Gewicht bei 15° bezogen auf Wasser von 4°.

Lösung	Refraktion der Lösung		Spezifisches Gewicht der Lösung	
	vor	nach	vor	nach
	dem Schütteln mit Tetrachlorkohlenstoff		dem Schütteln mit Tetrachlorkohlenstoff	
	R	R	d_4^{15}	d_4^{15}
Wasser	15,0	15,1	0,9991	0,9993
Milchzuckerlösungen				
etwa 5,5 %	35,5	35,65		
„ 7,2 „	42,2	42,4		
„ 7,7 „	43,9	44,1		
„ 10,5 „	55,1	55,2		
Spontanserum				
Milch a	43,1	43,2		
„ b	43,3	43,5	1,0284	1,0286
„ c	41,0	41,2	1,0263	1,0265

Dies geht aus den nachfolgenden Versuchen hervor, bei denen die Lichtbrechung verschiedener aus derselben Milch hergestellten, filtrierten und zentrifugierten Seren verglichen worden ist. Tabelle 3 zeigt zunächst, daß das Tetraserum I, mittels Zentrifugieren aus derselben Milch zu wiederholten Malen hergestellt, stets gleichmäßig ausfällt.

Tabelle 3. Nachweis, daß unter denselben Bedingungen aus derselben Milch stets das gleiche Tetraserum I entsteht.

R = Lichtbrechung in Skalenteilen des Zeißschen Eintauchrefraktometers bei 17,5°.

Milch Nr.	Probe a R	Probe b R	Probe c R	Probe d R	Probe e R	Probe f R
1	42,8	42,8	42,9	42,8	42,8	42,8
2	42,6	42,6	42,6			
3	42,9	42,9	42,9	42,9	42,9	
4	42,0	42,1	42,0	42,0		
5	42,3	42,3	42,3	42,3		
6	42,0	42,0	42,0	42,0		

Tabelle 4 (S. 252) beweist die Gleichwertigkeit des Filtrierens mit dem Zentrifugieren, wobei auch die einzelnen Teile der Filtrate voneinander nicht zu unterscheiden sind.

Bei den nach frühern Verfahren bei 40° hergestellten Seren konnten dagegen kleine Abweichungen zwischen den ersten und letzten Anteilen des Filtrates beobachtet werden, die um so stärker auftraten, je mehr sich die Poren des Filters verstopften.

[1]) Es wurden die Marken „Kohlenstofftetrachlorid CCl_4“ und „Kohlenstofftetrachlorid gereinigt“ von Kahlbaum benutzt.

Tabelle 4. Beeinflussung der Lichtbrechung der Tetraseren I beim Filtrieren durch Papierfilter verschiedener Dichte.

R = Skalenteile des Zeißschen Eintauchrefraktometers bei 17,5°.

Milch	Tetraserum I dargestellt durch				
	Zentrifugieren	Filtrieren durch Filter Schleicher-Schüll[1])			
		Nr. 588		Nr. 584	Nr. 572½
		erste Hälfte	zweite Hälfte		
		des Filtrats			
Nr.	R	R	R	R	R
1	43,7	43,7	43,7	43,7	
2	42,3	42,3	42,3	42,3	42,3
3	44,2	44,2	44,2		
4	44,3	44,2			

Durch die Anwendung von Tetrachlorkohlenstoff erübrigte sich auch die bisher zur Erleichterung der Klärung des Serums angewandte Erwärmung der Milch auf 40°, und wir konnten die Herstellung des Serums I vollständig bei Zimmertemperatur vornehmen, wobei jede Abscheidung von Albumin und Globulin ausgeschlossen ist.

Anderseits haben wir für das Tetraserum II die vorangehende Erwärmung im kochenden Wasserbade für 20 Minuten vorgeschrieben, weil dabei die Abscheidung alles gerinnbaren Eiweißes mit Sicherheit erfolgt und die Bedingungen für die Erwärmung bequem einzuhalten sind.

Um das Anwendungsgebiet beider Seren beurteilen zu können, war es notwendig die Beschaffenheit und chemische Zusammensetzung der Tetraseren festzustellen und mit denen der bisher üblichen Seren zu vergleichen und weiterhin zu ermitteln, inwieweit die verschiedenen Seren durch das Altern der Milch, durch Melkart, Melkzeit, Laktationsstadium, Fütterung, Gesundheitszustand der Tiere usw., ferner durch Erhitzen der Milch und durch Zusätze von Wasser und Fremdstoffen beeinflußt werden. Davon ist in den folgenden Abschnitten die Rede.

3. Eigenschaften der Tetraseren im Vergleich zu anderen Milchseren.

Zum Vergleich mit den Tetraseren wurden die wichtigsten der bisher üblichen Milchseren herangezogen. Diese Seren wurden folgendermaßen hergestellt.

Chlorcalciumserum nach Ackermann[2]): 30 ccm Milch wurden mit 0,25 ccm Chlorcalciumlösung, deren spezifisches Gewicht 1,1375 und deren Refraktion nach zehnfacher Verdünnung 26° des Eintauchrefraktometers beträgt, eine Viertelstunde lang im siedenden Wasserbad in einem Probierrohr von 25 cm Länge und 2,5 cm innerem Durchmesser mit Rückflußrohr von 22 cm Länge und 0,7 cm innerem Durchmesser erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die geringe Menge Kondenswasser im obern Teil des Probierrohres und im Kühlrohr durch vorsichtiges Umkehren (ohne Schütteln) mit dem neben dem Kaseinfettkuchen abgeschiedenen Serum vereinigt und dieses abgegossen.

---

[1]) Filter Nr. 588 ist ziemlich dünn, Nr. 584 ist dichter und Nr. 572½ am dichtesten.

[2]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genußm. **13**, 186 (1907).

Asaprolserum nach Baier und Neumann[1]): 15 ccm Milch wurden mit 15 ccm Asaprollösung (30 g Asaprol = β-Naphthol-α-sulfosaures Calcium und 55,8 g kristallisierte Citronensäure mit Wasser zu einem Liter aufgelöst) durchgeschüttelt und das Kasein-Fettgerinsel vom Serum durch Filtration abgetrennt.

Spontanserum: Milch wurde mit einer Spur geronnener Milch versetzt und bei Zimmertemperatur in einem zugepfropften Kolben bis zur Gerinnung sich selbst überlassen; nach etwa 48 Stunden wurde das Serum abfiltriert.

Albumin- und globulinhaltiges Essigsäureserum nach Burr, Berberich und Lauterwald[2]): 100 cm Milch wurden mit 2 ccm einer 20%igen Essigsäure versetzt, 20 Minuten lang auf dem Wasserbade auf 40° erwärmt, hierauf in Eiswasser abgekühlt und filtriert.

Albumin- und globulinhaltiges Essigsäureserum nach Stüber[3]): 100 ccm Milch wurden in einer Standflasche mit 2 ccm 20%iger Essigsäure (statt 0,4 ccm Eisessig) durchgeschüttelt, die Flasche 1—2 Stunden in ein Wasserbad von 50—60° eingehängt und das abgeschiedene Serum nach Eiskühlung durch Doppelfilter filtriert.

Von gerinnbarem Eiweiß freies Essigsäureserum (ohne Tetrachlorkohlenstoff): Die Milch wurde etwa 30 Minuten in einem Kolben mit Rückflußrohr erwärmt und nach dem Erkalten das Kondenswasser mit der Milch vereinigt. 100 ccm davon wurden mit 2 ccm einer 20%igen Essigsäure versetzt, kräftig durchgeschüttelt und filtriert, wobei bisweilen die ersten Anteile, weil sie zu trüb waren, weggegossen wurden.

Bleiserum nach Rothenfußer[4]) (für den Nachweis der Peroxydasen der Milch): 100 ccm Milch wurden mit 5—6 ccm Bleiessiglösung versetzt, stark geschüttelt und filtriert.

Durchsichtigkeit.

Das Tetraserum I war bei mehreren hundert Darstellungen immer so klar, daß die Lichtbrechung mit großer Schärfe bestimmt werden konnte. Das Tetraserum II war wasserklar, so daß es ohne weiteres für Polarisationsmessungen brauchbar war und dem Asaprolserum an Durchsichtigkeit kaum nachstand. Beide Tetraseren erwiesen sich klarer, als die zugehörigen Chlorcalcium-, Spontan- und die gewöhnlichen Essigsäureseren. Im Gegensatz zu den bei letztern oft beobachteten nachträglichen Trübungen haben wir bei den Tetraseren keine nachträglichen Veränderungen wahrgenommen.

Fettgehalt.

Da eine etwaige Fettemulsion im Serum die Ablesung der Refraktometer- und Polarisationswerte stört und insbesondere das spezifische Gewicht verringert (0,25% Fett würden etwa 0,16 Laktodensimetergraden entsprechen), so ist es als Vorzug der Tetraseren anzusehen, daß sie im Gegensatz zu den gewöhnlichen Essigsäureseren, Spontan- und Chlorcalciumseren praktisch fettfrei sind, wie folgende Tabelle 5 (S. 254) zeigt.

Verhalten beim Erhitzen.

Bei allen Seren, die noch Albumin enthalten, erhält man beim Erhitzen über freier Flamme, je nach der Menge des gerinnbaren Eiweißes einen in der Kälte nicht löslichen Niederschlag oder wenigstens eine Trübung.

---

[1]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genußm. **13**, 369 (1907).
[2]) Milchw. Zentralbl. **4**, 219 (1908).
[3]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genußm. **20**, 157 (1910).
[4]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genußm. **16**, 63 (1908).

Tabelle 5. Fettgehalt der verschiedenen Milchseren.

f = Gramme Fett in 100 ccm Milch.

Milch Nr.	Tetraserum I f	Tetraserum II f	Chlorcalciumserum f	Spontanserum f	Gewöhnliches Essigsäureserum [2] f
1	0,001	0,001	0,03	—	
2	0,001	0,001	0,04	0,02	
3	0,002	0,001	0,02	0,05	
4	0,003	0,001	—	0,02	
—	—	—	0,035 [1]	—	0,24 [2]

Die Tetraseren II sowie die albuminfreien gewöhnlichen Essigsäureseren geben beim Erhitzen über freier Flamme, soweit unsere Beobachtungen reichen, immer einen in der Kälte sich wieder lösenden Niederschlag, während das Chlorcalciumserum sich hierbei zuweilen, das Asaprolserum nie trübt. Ob diese Ausscheidungen auf Citrate oder andere, bisher nicht bekannte Stoffe zurückzuführen sind, sollen spätere Versuche erweisen.

Während wir beim Tetraserum I bei kurzem Erhitzen auf 65° in vorgewärmtem Wasserbade immer eine deutliche Trübung beobachten konnten, war dies bei den albuminhaltigen gewöhnlichen Essigsäureseren und beim Spontanserum schon wegen ihrer opaleszierenden Eigenschaften schwer oder nicht zu erkennen. Bei kurzem Erhitzen auf 70° erhält man im Tetraserum I starke Trübungen oder Fällungen; filtriert man davon ab, so ist bei etwa 90° eine zweite starke Fällung zu beobachten. Das Spontanserum scheint sich hierbei nach eigenen und andern Versuchen [3] in der Regel ähnlich zu verhalten. Bei den gewöhnlichen über 65° hergestellten Essigsäureseren hängt das Verhalten beim Erhitzen naturgemäß ganz von der Darstellungsart ab. (Vgl. hierzu die weiter unten angeführten Versuche über Seren von auf verschiedene Temperatur erhitzter Milch, S. 276 u. 277.)

Das Tetraserum II läßt bei andauerndem Erhitzen im kochenden Wasserbad oder bei 100° keine Änderung der Refraktion erkennen, wenn Wasserverluste vermieden werden. Auch beim Erhitzen auf 110°—120° in geschlossenen Gefäßen waren durch das Eintauchrefraktometer höchstens Änderungen von etwa 0,2° festzustellen.

Peroxydasengehalt.

Wie das Spontanserum und die unter 60° hergestellten gewöhnlichen Essigsäureseren, so enthält auch das Tetraserum I die Stoffe, welche die Peroxydasenreaktion geben. Die mit Phenylendiaminchlorhydrat-Guajakol (vergl. S. 275) ausgeführte Reaktion wurde

[1] nach Wiegner, Milchw. Zentralbl. 5, 486 (1909). Mittel aus 2 Analysen.

[2] nach Burr, Berberich und Lauterwald, Milchw. Zentralbl. 4, 224 (1908). Mittel aus 8 Analysen.

[3] Koning, Milchw. Zentralbl. 6, 127, 171, 222, 264 (1910). Mitunter beobachteten wir, wie Koning, beim Erhitzen von Spontanseren roher Milch auf 70—100° nur geringe Trübungen.

beschleunigt oder fiel momentan stärker aus, wenn die den Verlauf der Reaktion hemmende Säure bis zur beginnenden Trübung des Serums (Abscheidung von Calciumphosphaten) neutralisiert wurde, und war dann fast ebenso empfindlich als wenn sie nach Rothenfußer mit dem Bleiserum ausgeführt wurde (vergl. S. 275). Selbst an Tetraseren I, die 6 Monate im Eisschrank gestanden hatten, ließ sich die Peroxydasenreaktion noch nachweisen.

Mineralstoffgehalt.

Während bei der Bereitung des Chlorcalciumserums die Milch je nach ihrer Acidität beim Zusatz von Chlorcalcium wechselnde Mengen von Kaseinkalk, Calciumphosphaten, -citraten, -carbonaten abscheidet, so daß der Gehalt des Serums an Mineralstoffen auch bei derselben Milch in unvorhergesehener Weise wechseln kann, enthalten die beiden Tetraseren — und ebenso die gewöhnlichen Essigsäureseren, das Asaprol- und das Spontanserum — noch alle Salze der Milch gelöst, da die Calciumcarbonate, -phosphate, -citrate sowohl in Essigsäure als in der in Asaprollösung enthaltenen Citronensäure, wie auch in der beim Spontanserum durch Gärung gebildeten Milchsäure löslich sind.

Dies wurde durch eine Reihe von Versuchen bestätigt, bei denen in den verschiedenen Seren aus den gleichen Milchsorten der Gehalt an Calcium (Ca) und Phosphat (PO_4) bestimmt und unter Berücksichtigung der Verdünnung der Seren durch die Zusätze sowie beim Chlorcalciumserum unter Berücksichtigung des zugefügten Chlorcalciums auf den Ca- und PO_4-Gehalt der unveränderten Milch umgerechnet wurde. Die so berechneten, in Tabelle 6 (S. 256 u. 257) aufgenommenen Werte stimmen für die Tetraseren, Spontan- und Asaprolseren überein, während das Chlorcalciumserum hiernach viel weniger Calciumsalze und Phosphate enthält.

Stickstoffverbindungen.

Die Ergebnisse vergleichender Stickstoffbestimmungen in den verschiedenen Seren sind in Tabelle 7 (S. 256 u. 257) zusammengestellt. Der Gesamtstickstoffgehalt des Tetraserums I ist hiernach ebenso hoch wie im Spontanserum. In den von gerinnbarem Eiweiß befreiten Seren ist er naturgemäß geringer und zwar im Tetraserum II ungefähr so hoch wie im Chlorcalciumserum, während das Asaprolserum auch nach Berücksichtigung der Verdünnung die kleinsten Werte zeigt. Die gewöhnlichen Essigsäureseren enthalten um so weniger Gesamtstickstoff, je höher die Temperatur der Herstellung ist, weil der gerinnbare Stickstoff hierbei abnimmt.

Das Tetraserum I stimmt mit dem Spontanserum nicht nur im Gesamtstickstoff sondern auch in dem durch Gerbsäure fällbaren Stickstoff überein. Trotzdem ist sein Gehalt an gerinnbarem Eiweiß höher. Um zu prüfen, ob diese Beobachtung etwa darauf zurückzuführen sei, daß durch die gegenüber der Essigsäure stärkere Milchsäure des Spontanserums albuminartige Stoffe in Lösung gehalten werden, haben wir den Stickstoff des gerinnbaren Eiweißes in zwei Tetraseren, in Vergleich mit dem Stickstoff des zugehörigen Spontanserums, vor und nach der Neutralisation und nach

Tabelle 6. Calcium- und Phosphatgehalt

Milch Nr.	Tetraserum I				Tetraserum II			
	In 100 ccm Serum sind							
	Ca		PO_4		Ca		PO_4	
	gefunden	umgerechnet auf unverdünntes Serum	gefunden	umgerechnet auf unverdünntes Serum	gefunden	umgerechnet auf unverdünntes Serum	gefunden	umgerechnet auf unverdünntes Serum
1	0,097	0,099	0,210	0,214	0,097	0,099	0,212	0,216
2	0,114	0,116	0,202	0,206	0,114	0,116	0,205	0,209
3	0,115	0,117	0,234	0,238	0,116	0,118	0,236	0,240
4	0,115	0,117	0,228	0,232	0,115	0,117	0,227	0,231
5	—	—	—	—	0,115	0,117	0,241	0,245
6[1])	—	—	—	—	0,127	0,129	0,225	0,229
7	—	—	—	—	0,121	0,123	0,218	0,222
8	—	—	—	—	0,105	0,107	0,221	0,225
9	—	—	—	—	0,123	0,125	0,242	0,246
10[1])	—	—	—	—	0,105	0,107	0,221	0,225
11	—	—	—	—	0,103	0,105	0,232	0,236
12	—	—	—	—	0,110	0,112	0,214	0,218
13	—	—	—	—	0,109	0,111	0,221	0,225
14[1])	—	—	—	—	0,104	0,106	0,216	0,220

Tabelle 7. Vergleichende Bestimmung des

Die Zahlen bedeuten Gramme Stickstoff in 100 ccm Serum. Die eingeklammerten

Milch Nr.	Tetraserum I						Tetraserum II			
	Gesamtstickstoff		Gerbsäurestickstoff		Gerinnungsstickstoff		Gesamtstickstoff		Gerbsäurestickstoff	
1	0,125	(0,127)	—	—	—	—	0,044	(0,044)	—	—
2	0,106	(0,108)	—	—	—	—	0,029	(0,029)	—	—
3	0,114	(0,116)	—	—	—	—	0,053	(0,053)	—	—
4	0,119	(0,121)	0,098	(0,10)	—	—	0,057	(0,057)	0,026	(0,026)
5	0,118	(0,120)	0,111	(0,113)	0,085	(0,087)	0,029	(0,029)	0,017	(0,017)
6	0,119	(0,121)	—	—	0,079	(0,081)	0,040	(0,040)	—	—
7	0,124	(0,126)	0,100	(0,10)	0,076	(0,078)	0,044	(0,044)	0,025	(0,025)
8	0,124	(0,126)	—	—	0,079	(0,081)	0,051	(0,051)	—	—

[1]) Bei Milch Nr. 6 betrug die Differenz der Refraktion zwischen Tetraserum II und Chlorcalciumserum 1,4°. Die der Differenz des Calciumgehaltes sowie Phosphatgehaltes beider Seren entsprechenden Mengen Calciumcarbonat und Phosphorsäure erhöhten, in einer 7%igen Milchzuckerlösung unter Zuhilfenahme von 20%iger Essigsäure gelöst, deren Refraktionswert um 1,3°.

der verschiedenen Milchseren.

Spontanserum		Chlorcalciumserum				Asaprolserum			
enthalten in Grammen									
		Ca		PO_4		Ca		PO_4	
Ca	PO_4	gefunden	umgerechnet auf unverdünntes Serum ohne Zusatz	gefunden	umgerechnet auf unverdünntes Serum	gefunden	umgerechnet auf unverdünntes Serum	gefunden	umgerechnet auf unverdünntes Serum
0,100	0,218	0,062	0,009	0,087	0,088	—	—	—	—
0,117	0,205	0,068	0,015	0,087	0,088	—	—	—	—
0,115	0,236	0,064	0,011	0,096	0,097	—	—	—	—
0,115	0,233	0,063	0,010	0,100	0,101	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	0,149	0,114	0,119	0,238
—	—	0,067	0,014	0,104	0,105	—	—	—	—
—	—	0,072	0,019	0,117	0,118	—	—	—	—
—	—	0,069	0,016	0,094	0,095	—	—	—	—
—	—	0,057	0,004	0,120	0,121	—	—	—	—
—	—	0,062	0,009	0,112	0,113	—	—	—	—
—	—	0,062	0,009	0,107	0,108	—	—	—	—
—	—	0,063	0,010	0,104	0,105	—	—	—	—
—	—	0,060	0,007	0,109	0,110	—	—	—	—
—	—	0,062	0,009	0,109	0,110	—	—	—	—

Stickstoffgehaltes der verschiedenen Milchseren.

Zahlen beziehen sich auf unverdünntes Serum nach Abzug der Zusätze.

Spontanserum				Chlorcalciumserum				Asaprolserum	
Gesamtstickstoff	Gerbsäurestickstoff	Gerinnungsstickstoff		Gesamtstickstoff		Gerbsäurestickstoff		Gesamtstickstoff	
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,110	—	—	—	0,032	(0,032)	—	—	—	—
0,118	—	—	—	0,058	(0,058)	—	—	—	—
0,112	0,100	—	—	0,060	(0,060)	0,029	(0,029)	0,011	(0,022)
0,120	0,112	0,064	—	0,031	(0,031)	0,021	(0,021)	—	—
—	—	0,072	—	—	—	—	—	—	—
0,128	0,114	0,058	—	0,046	(0,046)	0,027	(0,027)	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

[2]) Bei Milch Nr. 10 betrug die Differenz der Refraktion zwischen Tetraserum II und Chlorcalcium 1,1°. In gleicher Weise wie bei Milch Nr. 6 wurde eine Refraktionserhöhung von 1,2° beobachtet.

[3]) Bei Milch Nr. 14 betrug die Differenz der Refraktion zwischen Tetraserum II und Chlorcalciumserum 1,0°. In gleicher Weise wie bei Milch Nr. 6 wurde eine Erhöhung von 1,1° beobachtet.

Zusatz von soviel Milchsäure, als geronnener Milch entspricht, bestimmt. Es wurde gefunden auf 100 ccm Serum g N:

	a) im Tetraserum I	b) im Spontanserum
vor der Neutralisation	0,076; 0,079	0,058; 0,059
nach „ „	0,075; 0,080	
nach Zusatz von Milchsäure	0,076; 0,080	

Es ergibt sich daher, daß die Säure bei dieser Verdünnung ohne wesentlichen Einfluß auf die Menge der geronnenen Eiweißstoffe ist. Deren Verminderung im Spontanserum im Gegensatz zu den durch Gerbsäure fällbaren Eiweißstoffen glauben wir daher mit Hofmeister[1]) auf die Einwirkung peptolytischer Fermente zurückführen zu dürfen.

Das Tetraserum II und ebenso das Chlorcalciumserum enthalten noch geringe Mengen solcher Eiweißstoffe, die durch Gerbsäure fällbar sind, während das Asaprolserum davon frei ist.

Die Differenz zwischen dem Stickstoffgehalt der Tetraseren I und II entspricht dem gerinnbaren Eiweiß des Tetraserums I.

Die Differenz zwischen dem Gesamtstickstoff des Tetraserums II und des Asaprolserums nach Berücksichtigung der Verdünnung entspricht dem Gerbsäurestickstoff des Tetraserums II.

Sonstige gelöste Stoffe.

Es ist nicht anzunehmen, daß die Tetraseren, die gewöhnlichen Essigsäureseren, das Chlorcalcium- und Asaprolserum abgesehen von dem Gehalt an Eiweiß, Calcium, Phosphorsäure und Citronensäure in dem Gehalt an andern gelösten Verbindungen voneinander wesentlich abweichen. Dagegen ist beim Spontanserum damit zu rechnen, daß die ursrünglich vorhandene Laktose mindestens z. T. in Milchsäure, die Citronensäure in Essigsäure und Kohlendioxyd übergegangen ist.

Lichtbrechung.

In Tabelle 8 sind die Lichtbrechungen verschiedener Seren für eine große Reihe von Milchsorten, nach der Höhe der Lichtbrechung des Tetraserums I geordnet, zusammengestellt. Die gewöhnlichen Essigsäureseren sind hierbei nicht berücksichtigt, weil schon aus einigen Versuchen hervorging, daß sich ihre Lichtbrechung, um immer dieselbe Differenz von 0,2 Refraktometergraden von den Tetraseren unterscheidet, sofern bei ihrer Herstellung die Erwärmungs- und Filtrationsbedingungen derart waren, daß ihr Gehalt an Eiweiß dem der Tetraseren entspricht.

Aus der Tabelle 8 geht hervor, daß in allen Fällen die Tetraseren I die höchste, die Tetraseren II eine um 1,5—3° geringere Lichtbrechung aufweisen. Dieser Unterschied ist auf den Gehalt des Tetraserums I an gerinnbarem Eiweiß zurückzuführen. In der Tat zeigt Tabelle 9, daß der Brechungsunterschied der beiden Seren für eine Reihe darauf untersuchter Milchsorten dem Unterschied des Stickstoffgehaltes proportional ist, und zwar entspricht eine Differenz der Lichtbrechung von 1 Refraktometergrad durchschnittlich einer Differenz von 0,329 g Stickstoff in 100 ccm

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 2, 294 (1878/79).

Tabelle 8. Vergleichende Zusammenstellung der Lichtbrechung verschiedener Milchseren.

R = Skalenteile des Zeißschen Eintauchrefraktometers bei 17,5°.

Milch Nr.	Tetraserum I R	Tetraserum II R	Chlorcalciumserum R	Spontanserum R	Asaprolserum R	Differenz der Lichtbrechung zwischen: Tetraserum I und II	Tetraserum II und Chlorcalciumserum	Tetraserum I und Spontanserum
1	45,3	42,5	41,0	—	—	2,8	1,5	—
2	45,1	42,4	41,0	—	—	2,7	1,4	—
3	44,7	41,6	40,1	43,8	—	3,1	1,5	0,9
4	44,7	41,6	40,1	43,7	—	3,1	1,5	1,0
5	44,3	41,3	—	—	—	3,0	—	—
6	44,2	41,2	39,6	—	—	3,0	1,6	—
7	44,2	41,1	39,6	—	—	3,1	1,5	—
8	44,2	41,2	39,6	—	—	3,0	1,6	—
9	44,1	41,0	39,6	—	—	3,0	1,4	—
10	44,1	41,6	40,2	—	—	2,5	1,4	—
11	44,1	41,8	40,3	43,3	—	2,3	1,5	0,8
12	44,0	42,1	41,0	—	—	1,9	1,1	—
13	44,0	40,8	—	—	—	2,2	—	—
14	44,0	41,9	40,6	—	—	3,1	1,3	—
15	44,0	41,0	39,5	—	—	3,0	1,5	—
16	44,0	40,9	39,4	—	—	3,1	1,5	—
17	44,0	41,0	39,6	—	—	3,0	1,4	—
18	44,0	42,0	40,4	43,2	—	2,0	1,6	0,8
19	44,0	42,2	40,9	—	—	1,8	1,3	—
20	43,9	40,8	39,5	—	—	3,1	1,3	—
21	43,9	42,1	40,7	—	—	1,8	1,4	—
22	43,9	40,9	39,4	—	—	3,0	1,5	—
23	43,9	41,0	39,6	—	—	2,9	1,4	—
24	43,8	42,1	40,9	—	—	1,7	1,2	—
25	43,8	42,0	39,7	—	—	1,8	1,3	—
26	43,7	42,1	41,1	—	—	1,6	1,0	—
27	43,6	40,7	39,4	—	—	2,9	1,3	—
28	43,6	42,1	41,0	—	—	1,5	1,1	—
29	43,6	40,7	39,2	—	—	2,9	1,5	—
30	43,6	40,7	39,1	—	—	2,9	1,6	—
31	43,6	41,2	39,8	—	—	2,4	1,4	—
32	43,6	40,7	39,2	—	—	2,9	1,5	—
33	43,6	42,0	40,9	—	—	1,6	1,1	—
34	43,6	40,7	39,3	42,8	—	2,9	1,4	0,8
35	43,6	41,5	40,1	—	—	2,1	1,4	—
36	43,6	40,7	39,3	42,6	—	2,9	1,4	1,0
37	43,6	41,5	40,3	—	—	2,1	1,2	—
38	43,5	40,7	39,2	—	—	2,8	1,5	—
39	43,5	42,0	40,9	—	—	1,5	1,1	—
40	43,5	41,8	40,8	—	—	1,7	1,0	—

Milch Nr.	Tetra-serum I R	Tetra-serum II R	Chlor-calcium-serum R	Spon-tan-serum R	Asaprol-serum R	Differenz der Lichtbrechung zwischen		
						Tetra-serum I und II	Tetra-serum II und Chlor-calcium-serum	Tetra-serum I und Spontan-serum
41	43,5	42,0	40,9	—	—	1,5	1,1	—
42	43,4	41,7	40,6	—	—	1,7	1,1	—
43	43,4	41,2	39,8	—	—	2,2	1,4	—
44	43,4	41,2	39,9	—	—	2,2	1,3	—
45	43,3	40,9	39,6	—	—	2,4	1,3	—
46	43,3	41,7	40,6	—	—	1,6	1,1	—
47	43,3	40,5	39,2	42,4	—	2,8	1,3	0,9
48	43,2	41,1	39,9	—	—	2,1	1,2	—
49	43,1	41,0	39,4	42,3	—	2,1	1,6	0,8
50	43,1	41,0	39,7	—	—	2,1	1,3	—
51	43,1	40,5	39,0	—	38,4	2,6	1,5	—
52	43,0	40,9	39,7	—	—	2,1	1,2	—
53	43,0	40,8	39,5	—	—	2,2	1,3	—
54	43,0	40,8	39,6	—	—	2,2	1,2	—
55	42,9	41,2	40,2	—	—	1,7	1,0	—
56	42,9	40,6	39,3	—	—	2,3	1,3	—
57	42,8	41,2	39,8	—	—	1,6	1,4	—
58	42,8	40,4	39,0	—	—	2,4	1,4	—
59	42,8	40,5	39,2	—	—	2,3	1,3	—
60	42,8	40,5	39,2	—	—	2,3	1,3	—
61	42,8	40,5	39,2	—	—	2,3	1,3	—
62	42,8	40,4	39,0	41,8	—	2,4	1,4	1,0
63	42,7	40,5	39,2	—	—	2,2	1,3	—
64	42,7	40,3	—	—	—	2,4	—	—
65	42,7	40,6	39,3	—	—	2,1	1,3	—
66	42,7	40,6	39,3	—	—	2,1	1,3	—
67	42,7	40,4	39,0	—	—	2,3	1,4	—
68	42,6	39,5	—	—	—	3,1	—	—
69	42,6	40,3	39,8	—	—	2,3	1,5	—
70	42,5	40,2	38,7	41,5	—	2,3	1,5	1,0
71	42,5	40,3	—	41,4	—	2,2	—	1,1
72	42,5	40,4	38,9	41,6	38,0	2,1	1,5	0,9
73	42,5	40,0	38,5	41,4	38,0	2,5	1,5	1,1
74	42,5	40,3	39,0	—	—	2,2	1,3	—
75	42,3	39,7	—	—	—	2,6	—	—
76	42,3	40,7	39,5	—	—	2,6	1,2	—
77	42,3	39,6	38,1	—	—	2,7	1,5	—
78	42,3	40,3	38,9	—	—	2,0	1,4	—
79	42,3	40,3	38,9	—	—	2,0	1,4	—
80	42,3	40,5	39,0	—	—	1,8	1,5	—
81	42,2	40,5	39,1	—	—	1,7	1,4	—
82	42,2	40,2	38,2	—	—	2,0	1,4	—
83	42,2	39,6	38,1	—	—	2,6	1,5	—
84	42,2	40,1	38,7	—	—	2,1	1,4	—
85	42,1	40,1	—	—	—	2,0	—	—
86	42,1	39,5	38,0	41,0	—	2,6	1,5	1,1
87	42,1	39,8	38,3	41,1	—	2,3	1,5	1,0

Milch Nr.	Tetraserum I R	Tetraserum II R	Chlorcalciumserum R	Spontanserum R	Asaprolserum R	Differenz der Lichtbrechung zwischen Tetraserum I und II	Differenz der Lichtbrechung zwischen Tetraserum II und Chlorcalciumserum	Differenz der Lichtbrechung zwischen Tetraserum I und Spontanserum
88	42,1	39,6	38,1	—	—	2,5	1,5	—
89	42,1	40,0	38,5	41,1	—	2,1	1,5	1,0
90	42,1	39,6	38,1	—	—	2,5	1,5	—
91	42,1	39,8	38,2	41,3	—	2,3	1,6	0,8
92	42,1	39,7	38,2	—	37,4	2,4	1,5	—
93	42,0	39,6	—	—	—	2,4	—	—
94	42,0	39,8	38,5	—	—	2,2	1,3	—
95	42,0	39,4	38,2	—	—	2,6	1,2	—
96	41,4	39,2	37,8	—	—	2,2	1,4	—
97	40,9	38,6	37,1	—	—	2,3	1,5	—
98	40,3	38,3	—	—	—	2,0	—	—
99	39,9	37,9	—	—	—	2,0	—	—
100	39,4	37,3	—	—	—	2,1	—	—

Tabelle 9. Vergleich der Refraktometerdifferenz von Tetraserum I und II mit der Differenz des Stickstoffgehalts.

R = Skalenteile des Zeißschen Eintauchrefraktometers bei 17,5°.
N = Gramme Stickstoff in 100 ccm.

Milch Nr.	Differenz zwischen Tetraserum I und II: $N_I - N_{II}$	Differenz zwischen Tetraserum I und II: $R_I - R_{II}$	Ein Grad Unterschied der Refraktometeranzeige entspricht daher Grammen Stickstoff $\frac{N_I - N_{II}}{R_I - R_{II}}$: im Einzelnen	im Durchschnitt	berechnet nach Wiegner
1	0,081	2,5	0,0324		
2	0,077	2,3	0,0334		
3	0,062	2,0	0,0310		
4	0,062	1,9	0,0326	0,0329	0,0337
5	0,089	2,6	0,0343		
6	0,079	2,4	0,0329		
7	0,080	2,5	0,0320		
8	0,073	2,1	0,0347		

Milch. Hiermit stimmt es vorzüglich überein, daß nach Wiegners Beobachtungen[1]) für je 0,0337 g Stickstoff einer Eiweißlösung (Pepton) sich ebenfalls eine Lichtbrechung von 1° berechnen läßt. Aus der Tabelle 8 geht weiter hervor, daß die Lichtbrechung vom Chlorcalciumserum um 1,0—1,6° geringer ist als die des Tetraserums II. Würde keine chemische Einwirkung durch den Zusatz von Chlorcalcium stattfinden, so sollten die beiden Lichtbrechungen übereinstimmen, da durch besondere Versuche festgestellt wurde, daß der Einfluß der Zusätze an sich in beiden Fällen die gleiche Er-

[1]) Milchw. Zentralbl. 5, 524 (1909).

höhung der Lichtbrechung um etwa 0,4—0,5 Refraktometergrade bewirkt. Die geringere Brechung der Chlorcalciumseren muß also auf die Entfernung von Lösungsbestandteilen und zwar im wesentlichen auf die oben schon nachgewiesene Ausfällung von Calciumsalzen zurückgeführt werden. Dies konnte durch den Versuch bestätigt werden: In einer etwa 7%igen Milchzuckerlösung, die mit der für das Serum vorgeschriebenen Menge Essigsäure versetzt war, wurde soviel Calciumcarbonat und Phosphorsäure aufgelöst wie bei der Herstellung der Chlorcalciumseren ausfällt; die erforderlichen Mengen wurden nach den Ergebnissen der Tabelle 6 S. 256/257 für einige Milchsorten mit bekannten Refraktometerwerten der beiden Seren berechnet. Diese Zusätze bewirkten eine Erhöhung der Lichtbrechung der Milchzuckerlösung um a) 1,3; b) 1,2; c) 1,0[1]) Refraktometergrade, während die Differenzen zwischen den Lichtbrechungen vom Tetraserum II und Chlorcalciumserum a) 1,4; b) 1,1; c) 1,0[1]) betrugen. Die Differenz der Lichtbrechung beider Seren ist also im wesentlichen durch die Ausfällung von Kalksalzen und Phosphaten bedingt. Citrate und Magnesiumsalze sind hierbei nicht berücksichtigt worden, obwohl sie vielleicht bei größeren Differenzen in Frage kommen können.

Auf Grund dieser Ergebnisse kann die Annahme von Ackermann[2]), daß durch den Zusatz von 0,25 ccm 15%iger Chlorcalciumlösung zu 30 ccm Milch die Lichtbrechung des Milchserums unbedeutend geändert werde, nicht bestätigt werden.

Das Spontanserum zeigt eine um 0,8—1° niedrigere Brechung als das Tetraserum I. Diese Differenz ist zum Teil (0,4°) auf die Abwesenheit der Essigsäure und des Tetrachlorkohlenstoffes, zum andern Teil aber auf die mit der freiwilligen Gerinnung der Milch vor sich gehenden Umsetzungen des Milchzuckers in Laktose und der Citronensäure in Essigsäure und Kohlendioxyd zurückzuführen. Die Umwandlung des gerinnbaren Eiweißes in seine Abbauprodukte ist ohne Einfluß auf die Lichtbrechung.

Da man bei der Untersuchung von geronnener Milch auf das Spontanserum angewiesen ist, so erscheint es bemerkenswert, daß die Differenz zwischen Spontanserum und Tetraserum I trotz der scheinbar unkontrollierbaren Gärungsvorgänge in der gerinnenden Milch nahezu konstant ist.

Erhitzt man das Spontanserum 20 Minuten im kochenden Wasserbade, so verringert sich naturgemäß die Lichtbrechung durch das Ausfallen der Eiweißstoffe; aber wie aus der Tabelle 10 hervorgeht, ist die Abnahme geringer als die Differenz der Lichtbrechung der Tetraseren I und II, weil, wie schon oben gezeigt wurde, die gerinnbaren Eiweißstoffe im Spontanserum zum Teil abgebaut sind (vgl. S. 254, 255 u. 258).

Das Asaprolserum sollte eine nur wenig geringere Lichtbrechung als das Tetraserum II zeigen, da beide Seren mit Ausnahme einer geringen Eiweißmenge, die für die Refraktion nicht in Betracht kommt, dieselben Milchbestandteile enthalten und die Fällungslösung des Asaprolserums so gewählt ist, daß sie seine Lichtbrechung nicht ändert, während die des Tetraserums II durch seine Zusätze um 0,4° erhöht wird.

[1]) Mittel aus je zwei Versuchen.

[2]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr- u. Genußm. **13**, 186 (1907).

Tabelle 10. Veränderung der Lichtbrechung des Spontanserums vor und nach dem Erhitzen im kochenden Wasserbade im Vergleich zur Lichtbrechung der Tetraseren.

R = Skalenteile des Zeißschen Eintauchrefraktometers bei 17,5°.

Milch Nr.	Tetraserum I R	Tetraserum II R	Differenz	Spontanserum vor dem Erhitzen R	Spontanserum nach dem Erhitzen R	Differenz
1	42,1	39,5	2,6	41,0	38,8	2,2
2	44,7	41,6	3,1	43,9	41,2	2,7
3	44,7	41,6	3,1	43,8	41,0	2,8
4	43,1	41,0	2,1	42,3	40,5	1,8

In Wirklichkeit wurden jedoch wie Tabelle 8 zeigt viel geringere Brechungen des Asaprolserums erhalten. Für diese überraschende Beobachtung bot sich die Erklärung, daß bei der Fällung des Kaseins ein Teil des Asaprols, sei es als salzartige Kaseinverbindung oder adsorbiert, mitgerissen wird. Es gelang uns auch, in der gut ausgewaschenen Kaseinfällung Asaprol durch die Diazoreaktion nachzuweisen und in dem überstehenden Serum durch die Bestimmung des Schwefelgehaltes einen Verlust von Asaprol festzustellen.

Spezifisches Gewicht.

Wie die Lichtbrechung, so ist auch das spezifische Gewicht eine annähernd additive Eigenschaft der Lösung, d. h. eine solche, deren Werte sich aus den einzelnen Lösungsbestandteilen nach der Mischungsregel zusammensetzen. Beide Eigenschaften werden also den Gehalt der Milchseren an den in wechselnden Mengen vorkommenden Stoffen annähernd erkennen lassen, und es fragt sich nur, ob die Lichtbrechung oder das spezifische Gewicht hierfür empfindlicher und daher besser geeignet ist. Um dies zu entscheiden, haben wir für eine größere Reihe von Milchsorten die Lichtbrechung der beiden Tetraseren mit den zugehörigen spezifischen Gewichten verglichen. Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle 11, nach der Höhe der Refraktion geordnet, zusammengestellt. Die spezifischen Gewichte wurden mit dem Pyknometer bei 15° bestimmt und auf Wasser von 4° bezogen.

In der weiteren Tabelle 12 sind die entsprechenden Vergleiche für das Chlorcalciumserum nach den Messungen von Wiegner[1]) und für eine weitere Reihe von Spontanseren nach Messungen von Matthes und Müller[2]) wiedergegeben. In allen Fällen haben wir die spezifischen Gewichte auf die hoffentlich immer mehr Anwendung findende Einheit: Wasser von 4° (d_4^{15}) umgerechnet und daraus die Laktodensimetergrade: $L_4^{15} = (d_4^{15} - 1) \cdot 1000$ berechnet. Die Laktodensimetergrade sind von

[1]) Milchw. Zentralbl. **5**, 473, 521 (1909).
[2]) Zeitschr. f. öffentl. Chem. **1903**, 173.

Tabelle 11. Vergleich von Lichtbrechung und spezifischem Gewicht der beiden Tetraseren.

R = Skalenteile des Zeißschen Eintauchrefraktometers bei 17,5 °.
d_4^{15} = spezifisches Gewicht bei 15 ° bezogen auf Wasser von 4 °.
L_4^{15} = Laktodensimetergrade bei 15° bezogen auf Wasser von 4 ° = $(d_4^{15} - 1) \cdot 1000$.

Milch	Tetraserum I			R − 15 + 0,4	Milch	Tetraserum II			R − 15 + 1,7
Nr.	R	d_4^{15}	L_4^{15}		Nr.	R	d_4^{15}	L_4^{15}	
1	44,7	1,0301	30,1	30,1	6	41,7	1,0286	28,6	28,4
2	44,1	1,0294	29,4	29,5	1	41,6	1,0283	28,3	28,3
3	44,0	1,0293	29,3	29,4	2	41,6	1,0284	28,4	28,3
4	43,8	1,0291	29,1	29,2	7	41,1	1,0278	27,8	27,8
5	43,6	1,0289	28,9	29,0	3	41,0	1,0278	27,8	27,7
6	43,5	1,0290	29,0	28,9	8	41,0	1,0278	27,8	27,7
7	43,3	1,0287	28,7	28,7	4	40,9	1,0274	27,4	27,6
8	43,1	1,0282	28,2	28,5	10	40,6	1,0275	27,5	27,3
9	42,8	1,0283	28,3	28,2	12	40,4	1,0270	27,0	27,1
10	42,7	1,0281	28,1	28,1	5	40,2	1,0269	26,9	26,9
11	42,5	1,0279	27,9	27,9	9	40,1	1,0269	26,9	26,8
12	42,3	1,0280	28,0	27,7	14	39,8	1,0264	26,4	26,5
13	42,3	1,0276	27,6	27,7	17	39,6	1,0261	26,1	26,3
14	42,1	1,0276	27,6	27,5	15	39,5	1,0263	26,3	26,2
15	42,1	1,0271	27,1	27,5					
16	42,1	1,0278	27,8	27,5					
17	41,8	1,0274	27,4	27,2					

derselben Größenordnung wie die Refraktometergrade und haben auch annähernd dieselbe Messungsgenauigkeit.

Aus Tabelle 11 ergibt sich zunächst, daß bei jedem der beiden Tetraseren spezifisches Gewicht und Lichtbrechung miteinander parallel laufen, daß aber der gleichen Lichtbrechung beim Tetraserum II ein höheres spezifisches Gewicht entspricht als beim Tetraserum I. Es folgt schon hieraus, daß der Eiweißgehalt des Tetraserums I die Lichtbrechung in höherem Maße beeinflußt als das spezifische Gewicht.

Zieht man von den Refraktometergraden die der Lichtbrechung des Wassers entsprechenden 15 ° ab, so ist diese Differenz beim Tetraserum I im Mittel um 0,4, beim Tetraserum II im Mittel um 1,7 Einheiten geringer als die Laktodensimetergrade. Auf Grund dieser Beziehung lassen sich daher die Laktodensimetergrade aus den Refraktometergraden berechnen und umgekehrt, wie aus den betreffenden Spalten der Tabelle hervorgeht. (Bezieht man das spezifische Gewicht auf Wasser von 15 °, so sind die Differenzen um 0,9 Einheiten größer.)

Der gleiche Unterschied zwischen Refraktometer- und Laktodensimetergraden wie beim Tetraserum I berechnet sich in der Regel (vgl. Tab. 12) auch beim Spontanserum aus den Messungen von Matthes und Müller, während beim Chlorcalciumserum die um 15 verminderten Refraktometergrade im Mittel um 1,1 Einheiten hinter den Laktodensimetergraden zurückbleiben.

Tabelle 12. Vergleich von Lichtbrechung und spezifischem Gewicht des Chlorcalcium- und Spontanserums.

R = Skalenteile des Zeißschen Eintauchrefraktometers bei 17,5°.

d^{15}_{15} = spezifisches Gewicht bei 15° bezogen auf Wasser von 15°.

d^{15}_{4} = spezifisches Gewicht bei 15° bezogen auf Wasser von 4°.

L^{15}_{4} = Laktodensimetergrade bei 15° bezogen auf Wasser von 4° = $(d^{15}_{4} - 1) \cdot 1000$.

Milch	Chlorcalciumserum						Milch	Spontanserum				
	nach Beobachtungen von Wiegner							nach Beobachtungen von Matthes u. Müller				
Nr.	R	d^{15}_{15}	d^{15}_{4}	L^{15}_{4}	R−15+1,1		Nr.	R	d^{15}_{15}	d^{15}_{4}	L^{15}_{4}	R−15+0,4
1	38,5	1,0253	1,0244	24,4	24,6	Tabelle 1 S. 482	1	44,0	1,0328	1,0319	31,9	29,4
2	38,9	1,0257	1,0248	24,8	25,0		2	43,8	1,0301	1,0292	29,2	29,2
3	38,8	1,0260	1,0251	25,1	24,9		3	43,6	1,0299	1,0290	29,0	29,0
4	38,5	1,0251	1,0242	24,2	24,6		4	43,8	1,0297	1,0288	28,8	29,2
5	38,6	1,0256	1,0247	24,7	24,7		5	43,1	1,0297	1,0288	28,8	28,5
6	38,8	1,0259	1,0250	25,0	24,9		6	43,0	1,0294	1,0285	28,5	28,4
							7	42,6	1,0293	1,0284	28,4	28,0
7	39,1	1,0264	1,0255	25,5	25,2	Tabelle 2 S. 482	8	42,7	1,0292	1,0283	28,3	28,1
8	40,2	1,0272	1,0263	26,3	26,3		9	43,0	1,0291	1,0282	28,2	28,4
9	40,8	1,0276	1,0267	26,7	26,9		10	42,5	1,0289	1,0280	28,0	27,9
10	39,7	1,0269	1,0260	26,0	25,8		11	42,4	1,0289	1,0280	28,0	27,8
11	40,0	1,0270	1,0261	26,1	26,1		12	42,4	1,0289	1,0280	28,0	27,8
12	40,1	1,0273	1,0264	26,4	26,2		13	42,3	1,0288	1,0279	27,9	27,7
13	40,0	1,0273	1,0264	26,4	26,1		14	42,2	1,0287	1,0278	27,8	27,6
14	39,5	1,0267	1,0258	25,8	25,6		15	42,4	1,0287	1,0278	27,8	27,8
15	39,2	1,0257	1,0248	24,8	25,3		16	42,4	1,0286	1,0277	27,7	27,8
16	39,7	1,0264	1,0255	25,5	25,8		17	42,2	1,0286	1,0277	27,7	27,6
							18	42,9	1,0285	1,0276	27,6	27,8
17	40,0	1,0268	1,0259	25,9	26,1	Tabelle 3 S. 483	19	42,6	1,0285	1,0276	27,6	28,0
18	39,9	1,0268	1,0259	25,9	26,0		20	42,2	1,0284	1,0275	27,5	27,6
19	39,8	1,0268	1,0259	25,9	25,9		21	41,9	1,0283	1,0274	27,4	27,3
20	40,0	1,0271	1,0262	26,2	26,1		22	41,8	1,0282	1,0273	27,3	27,2
21	39,6	1,0270	1,0261	26,1	25,7		23	41,5	1,0282	1,0273	27,3	26,9
22	40,5	1,0278	2,0269	26,9	26,9		24	41,9	1,0281	1,0272	27,2	27,3
23	39,8	1,0266	1,0257	25,7	25,9		25	42,0	1,0280	1,0271	27,1	27,4
24	40,3	1,0270	1,0261	26,1	26,4		26	41,3	1.0278	1,0269	26,9	26,7
							27	41,3	1,0277	1,0268	26,8	26,7
25	38,7	1,0257	1,0248	24,8	24,8	Tab. 4 S. 484	28	41,3	1,0276	1,0267	26,7	26,7
26	39,1	1,0258	1,0249	24,9	25,2		29	41,2	1,0275	1,0266	26,6	26,6
27	39,6	1,0266	1,0257	25,7	25,7		30	41,3	1,0276	1,0267	26,7	26,7
28	38,5	1,0265	1,0266	26,6	25,5		31	41,2	1,0274	1,0265	26,5	26,6
							32	40,9	1,0273	1,0264	26,4	26,3
29	36,8	1,0240	1,0231	23,1	22,9	Tabelle 5 S. 484	33	40,1	1,0272	1,0263	26,3	25,5
30	37,7	1,0245	1,0236	23,6	23,8		34	40,6	1,0272	1,0263	26,3	26,0
31	37,1	1,0237	1,0228	22,8	23,2		35	40,7	1,0270	1,0261	26,1	26,1
32	36,7	1,0239	1,0230	23,0	22,8		36	40,1	1,0268	1,0259	25,9	25,5
33	37,8	1,0230	1,0221	22,1	23,9		37	40,6	1,0266	1,0257	25,7	26,0
34	36,8	1,0241	1,0232	23,2	22,9		38	40,0	1,0264	1,0255	25,5	25,4
35	37,3	1,0255	1,0246	24,6	23,4		39	39,9	1,0263	1,0254	25,4	25,3
36	36,6	1,0240	1,0231	23,1	22,7		40	39,8	1,0261	1,0252	25,2	25,2
37	37,8	1,0248	1,0239	23,9	23,9		41	39,4	1,0259	1,0250	25,0	24,8
38	37,3	1,0244	1,0235	23,5	23,4		42	39,1	1,0256	1,0247	24,7	24,5
39	37,4	1,0249	1,0240	24,0	23,5		43	39,0	1,0255	1,0246	24,6	24,4
40	37,5	1,0243	1,0234	23,4	23,6		44	38,2	1,0246	1,0237	23,7	23,6
							45	36,8	1,0233	1,0224	22,4	22,2
							46	37,3	1,0231	1,0222	22,2	22,7

Die Abweichungen sind darauf zurückzuführen, daß die in den verschiedenen Seren verschiedenen Mengen der gelöst bleibenden Stoffe Refraktion und Dichte nicht ganz in derselben Weise beeinflussen. Insbesondere gilt dies, wie schon oben erwähnt, von Eiweißstoffen. Besonders deutlich geht dies aus Tabelle 13 hervor. Darnach sind die Differenzen zwischen den Laktodensimetergraden von Tetraserum I und II durchschnittlich um die Hälfte kleiner als die entsprechenden Differenzen der Refraktometergrade.

Die oben aufgeworfene Frage nach der Empfindlichkeit ist also dahin zu beantworten, daß wenigstens für den Gehalt an Eiweißstoffen die Lichtbrechung wesentlich empfindlicher ist als das spezifische Gewicht.

Tabelle 13. Vergleich zwischen der Differenz der Lichtbrechung und der Differenz der spezifischen Gewichte von Tetraserum I und II.

R = Skalenteile des Zeißschen Eintauchrefraktometers bei 17,5°.
L = Laktodensimetergrade bei 15°, bezogen auf Wasser von 4°.

Milch Nr.	Refraktion des Tetraserums I R^I	Refraktion des Tetraserums II R^{II}	Laktodensimetergrade des Tetraserums I L^I	Laktodensimetergrade des Tetraserums II L^{II}	$R^I - R^{II}$	$L^I - L^{II}$
1	44,7	41,6	30,1	28,4	3,1	1,7
2	44,7	41,6	30,1	28,4	3,1	1,7
3	44,1	41,0	29,4	27,8	3,1	1,6
4	44,1	41,0	29,4	27,8	3,1	1,6
5	44,0	41,0	29,3	27,7	3,0	1,6
6	44,0	41,0	29,3	27,7	3,0	1,6
7	43,8	40,9	29,1	27,4	2,9	1,7
8	43,5	41,7	29,0	28,6	1,8	0,4
9	43,3	41,4	28,7	27,8	1,9	0,9
10	43,1	41,0	28,2	27,8	2,1	0,4
11	42,8	40,1	28,4	26,9	2,7	1,5
12	42,5	40,2	27,9	26,9	2,3	1,0
13	42,3	40,4	28,0	27,0	1,9	1,0
14	42,1	39,5	27,6	26,3	2,6	1,3
15	42,1	40,0	27,1	26,8	2,1	0,3
16	41,8	39,6	27,4	26,1	2,2	1,3

Einfluß der selbsttätigen Veränderung der Milch.

In Tabelle 14 ist die Veränderung der Lichtbrechung und des spezifischen Gewichtes der Tetraseren, des Chlorcalciumserums und des Spontanserums verschiedener Milchproben mit dem Alter der Milch dargestellt. Um die Werte der Lichtbrechung und des spezifischen Gewichtes der Tetraseren geronnener Milch mit denen frischer Milch unmittelbar vergleichen zu können, wurden abgemessene Volumina Milch der Säuerung überlassen und nach dem Gerinnen mit denselben Mengen Essigsäure und Tetrakohlenstoff versetzt wie nichtgeronnene Milch. Entsprechend wurde beim Chlorcalciumserum verfahren. Aus der Tabelle geht hervor, daß die Lichtbrechung bei den Tetraseren

Tabelle 14. Verhalten der Milchseren beim Altern der Milch.

R = Lichtbrechung in Graden des Zeißschen Eintauchrefraktometers bei 17,5°.
d_4^{15} = spezifisches Gewicht bei 15° bezogen auf Wasser von 4°.
S = Säuregrade nach Soxhlet-Henkel.

Milch Nr. und Tag der Messung	S	Tetraserum I		Tetraserum II		Chlorcalciumserum	Spontanserum	
		R	d_4^{15}	R	d_4^{15}	R	R	d_4^{15}
1) 1. Tag	7,2	43,7	—	40,9		39,3		
2. „	7,5	43,6	1,0287	40,8	—	39,3	—	—
3. „	26,0 [1])	42,8	—	40,0		40,5 [2])		
2) 1. Tag	7,8	43,5	—	40,7	—	39,2		
2. „	15,3	43,3	1,0286	40,5	1,0274	39,3 [2])	—	—
3. „	25,0 [1])	42,9	—	40,3	1,0271	40,2 [2])		
3) 1. Tag	7,0	43,6	1,0289	40,7		39,2	—	
2. „	9,3	43,6	—	40,7	—	39,2	—	—
3. „	19,0	43,0	1,0281	40,5		40,5 [2])	—	
4. „	26,0 [1])	42,8	1,0280	40,2		41,0 [2])	42,5	
4) 1. Tag	6,6	43,9		41,0		39,6		
2. „	16,9	43,6	—	40,9	—	39,8 [2])	—	—
3. „	25,2 [1])	43,4		40,5		40,2 [2])		
5) 1. Tag	6,0	42,3	1,0276	39,7		38,0		
2. „	10,9	42,2	—	39,6	—	38,1 [2])	—	—
3. „	26,0 [1])	41,7	1,0270	39,0		39,0 [2])		
6) 1. Tag	6,8	44,1		41,2		39,7	—	—
2. „	—	—	—	—	—	—	—	—
3. „	24,5 [1])	43,4		—		—	43,1	1,0284
7) 1. Tag	6,8	44,1	1,0294	41,0	—	39,6		
2. „	16,7	43,8	1,0291	40,9	1,0274	39,8 [2])	—	—
3. „	25,0 [1])	43,5	—	40,4	—	40,5 [2])		
8) 1. Tag	6,6	42,5	—	40,2	—	38,7	—	—
2. „	16,5	42,4		40,1		38,9 [2])		
9) 1. Tag	6,6	42,1	1,0276	39,5	—	38,0	—	
2. „	16,5	41,8	1,0273	39,2	1,0258	38,3 [2])	—	—
3. „	22,0	41,6	1,0271	39,0	—	39,0 [2])	41,0	
10) 1. Tag	6,7	42,7	—	40,6	—	39,0	—	
2. „	14,6	42,4	—	40,1	—	38,9 [2])	—	—
3. „	18,9	42,3	1,0280	40,4	1,0270	39,3 [2])	—	
4. „	26,2 [1])	41,9	—	—	—	—	41,5	
11) 1. Tag	7,0	43,1	1,0282	41,0		39,4	—	
2. „	18,3	42,6	—	40,8	—	39,7 [2])	—	—
3. „	—	—	—	—		—	42,3	
12)	—	44,1	1,0294	—		—	43,1	1,0284
13)	—	44,1	1,0294	—		—	43,3	1,0284
14)	—	44,0	1,0293	—	—	—	43,3	1,0283
15)	—	43,6	1,0289	—		—	42,7	1,0277
16)	—	43,1	1,0282	—		—	42,3	1,0275

[1]) Die Milch war geronnen.
[2]) Das Serum mußte filtriert werden.

mit steigendem Alter der Milch abnimmt, wie es im Hinblick auf die bekannten Gärungsvorgänge zu erwarten ist, bei denen Milchzucker in Milchsäure, Citronensäure in Essigsäure und Kohlendioxyd umgesetzt wird. Auf 0,5% Milchzucker würde sich, falls die Umsetzung quantitativ nach der Gleichung

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = 4C_3H_6O_3$$

verlaufen würde, eine Verminderung von 0,3 Refraktometergraden, auf die Umsetzung von 0,2% Citronensäure in Essigsäure und Kohlendioxyd ebenfalls eine Verminderung um etwa 0,3, zusammen also eine Verminderung von 0,6 Refraktometergraden berechnen. Nach vorliegenden Versuchen werden diese Werte erst nach dem Gerinnen der Milch erreicht, während bis zu etwa 15—16 Säuregraden (nach Soxhlet) nur eine ganz unwesentliche Abnahme der Refraktion erfolgt.

Im Gegensatz hierzu nimmt, wie die Tabelle zeigt, die Lichtbrechung des Chlorcalciumserums bei freiwilliger Säuerung der Milch zu. Dies ist jedoch nicht, wie Mai und Rothenfusser[1]) irrtümlicherweise annehmen, auf die entsprechend stärkere Lichtbrechung der Milchsäure gegenüber Laktose, sondern auf den Umstand zurückzuführen, daß die entstandene Milchsäure die durch die Einwirkung des Chlorcalciums abgeschiedenen Calciumsalze wieder auflöst.

Durch besondere Versuche, bei denen das Calcium im Chlorcalciumserum frischer und gesäuerter Milch bestimmt wurde, konnte diese Schlußfolgerung bestätigt werden. Die Zunahme der Lichtbrechung des Chlorcalciumserums ist indessen bis zu etwa 16 Säuregraden (nach Soxhlet) ebenfalls ganz unerheblich. Die Chlorcalciumseren werden jedoch im Gegensatz zu den gleichmäßig klar herstellbaren Tetraseren schon bei beginnender, noch mehr bei vorgeschrittener Säuerung der Milch trübe, so daß die Lichtbrechung ohne Filtration der Seren überhaupt nicht und selbst nach Filtration oft nur unscharf zu bestimmen war (vergl. S. 287).

Die Refraktometerwerte des Spontanserums liegen auch hier um etwa 0,8—1,1 niedriger als die des Tetraserums I von frischer Milch. Von dem Tetraserum I eben geronnener Milch unterscheiden sie sich jedoch nur um die durch den Zusatz von Essigsäure und Tetrachlorkohlenstoff bewirkte Erhöhung der Lichtbrechung.

Tabelle 15. Veränderung der Lichtbrechung des Spontanserums mit dem Alter der Milch.

R = Skalenteile des Zeißschen Eintauchrefraktometers bei 17,5°.

Milch	Tetraserum I	Spontanserum		
		am dritten	am vierten	am fünften
		Tage nach der Melkung		
Nr.	R	R	R	R
1	43,6	42,5	42,4	42,3
2	44,1	43,4	43,3	43,3
3	43,6	42,7	42,6	42,4
4	44,7	43,9	43,8	43,6

[1]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genußm. **16**, 14 (1908).

In einigen besondern Versuchen (Tab. 15) wurde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Analytiker gefunden, daß die Lichtbrechungen der innerhalb einiger Tage nach dem Melken hergestellten Spontanseren unwesentlich von einander abweichen.

Daß die Lichtbrechung des Asaprolserums sich beim Altern der Milch ähnlich verhalten muß wie die der Tetraseren, ist ohne weiteres zu erwarten. Da aber die in Betracht kommenden, die Lichtbrechung beeinflussenden Stoffe durch die Asaprollösung auf das Doppelte verdünnt werden, so sind die zu beobachtenden Abnahmen der Lichtbrechung um die Hälfte geringer und daher bei geringern Säuregraden kaum noch wahrnehmbar.

Im Hinblick auf die früher erörterten Beziehungen zwischen Lichtbrechung und spezifischem Gewicht war zu erwarten, daß auch bei zunehmendem Altern der Milch diese beiden Werte sich annähernd parallel ändern, wie dies Tabelle 14 auch zeigt.

Einfluß der Melkart, Melkzeit, Fütterung, Laktationszeit, Individualität, Rasse, Gesundheitszustand der Kühe usf.

Für die Frage der Verwendbarkeit der Tetraseren war es von besonderer Wichtigkeit zu wissen, inwieweit die Lichtbrechung durch die in der Überschrift genannten Faktoren beeinflußt werde. Ohne daß über alle diese Punkte ausgedehnte Versuchsreihen vorliegen, läßt sich schon jetzt eine Reihe von wichtigen Schlüssen ziehen.

Die Lichtbrechung des Tetraserums I setzt sich zusammen aus der des Milchzuckers, der Citronensäure, der Mineralstoffe und der albumin- und globulinartigen Stoffe. Im Tetraserum II fehlen die letztern bis auf einen kleinen sich nahezu gleich bleibenden Rest. Es ist nun aus bisher ausgeführten Milchanalysen ersichtlich, daß durch Melkzeit und Melkart der Gehalt der fettfreien Milch an Milchzucker, an Mineralstoffen und an albumin- und globulinartigen Stoffen nicht wesentlich verändert wird. Durch Fütterungswechsel bei bekömmlichem Futter hat man nur kleine unerhebliche Änderungen im Gehalt an Eiweißstoffen beobachtet. Über die Veränderung von Citronensäure durch diese Einflüsse ist bisher nichts bekannt. Nimmt man an, daß der Gehalt der Milch einer Kuh an Citronensäure um die Hälfte seines mittlern Wertes schwankt, so würde selbst dann nur mit einer Verschiebung der Refraktometergrade um etwa 0,2 zu rechnen sein, was etwas über den Fehlergrenzen liegt.

Mit der Individualität und Rasse der Kühe können sich allerdings die Mengen der in den Seren gelösten Stoffe mehr verschieben. Bei Sammelmilch scheinen jedoch auch hier keine großen Abweichungen vorzukommen; denn nach Cornalba[1]) ist der fett- und kaseinfreie Trockenrückstand der Herdenmilch von allen analytisch bekannten Werten der Milch den kleinsten Schwankungen unterworfen. Hätte Cornalba die Werte nicht auf die ganze Milch, sondern auf fett- und kaseinfreie Milch bezogen, so würde er die Schwankungen noch kleiner gefunden haben, weil dann die Beeinflussung der Zahlen durch den schwankenden Fett- und Kaseingehalt fortfällt. Die auf fett- und kaseinfreie Milch bezogenen Zahlen entsprechen nun den im Tetraserum I

[1]) Rev. gén. du Lait 7, 33 und 56 (1908).

gelösten Stoffen. Da bei gleichem Trockenrückstand des Serums kleine Verschiebungen der einzelnen darin enthaltenen Stoffe die Lichtbrechung ungefähr gleich beeinflussen, so kann die Lichtbrechung ebenfalls nur geringen Schwankungen unterliegen. Auch die Lichtbrechung des Tetraserums II wird annähernd dieselben geringen Abweichungen zeigen, da der Gehalt an albumin- und globulinartigen Stoffen in Sammelmilch nur sehr geringen Schwankungen unterliegt.

Diese Annahmen werden, soweit sie Einzelmilch betreffen, durch eine Reihe von Messungen bestätigt, die wir an den Seren der Milch einzelner Kühe längere Zeit fortgesetzt haben und deren Ergebnisse in den Tabellen 16 und 17 zusammengestellt sind.

Tabelle 16. Lichtbrechung der beiden Tetraseren sowie des Chlorcalciumserums der Milch von Einzelkühen

a) bei gebrochenem Melken; b) bei Morgen-, Mittag- und Abendmilch.

R = Skalenteile des Zeißschen Eintauchrefraktometers bei 17,5°.

a)

Milch Nr.	Tetraserum I		Tetraserum II		Chlorcalciumserum	
	Anfangs-Gemelk R	End-Gemelk R	Anfangs-Gemelk R	End-Gemelk R	Anfangs-Gemelk R	End-Gemelk R
1	42,2	42,2	40,1	40,1	38,7	38,7
2	42,3	42,3	40,3	40,3	38,9	38,9
3	42,3	42,3	40,5	40,5	39,0	39,0
4	42,2	42,2	40,2	40,2	38,8	38,8
5	43,0	43,0	40,9	40,9	39,7	39,7
6	41,6	41,6	—	—	—	—
7	41,6	41,7	—	—	—	—
8	42,8	42,8	41,2	41,2	39,8	39,8

b)

Milch Nr.	Art der Milch nach der Tageszeit	Tetraserum I R	Tetraserum II R	Chlorcalciumserum R
1	Morgenmilch	42,8	40,5	39,2
	Mittagmilch	42,7	40,5	39,2
	Abendmilch	42,8	40,5	39,2
2	Morgenmilch	42,9	40,6	39,3
	Mittagmilch	42,8	40,5	39,2
	Abendmilch	42,7	40,3	39,1

Aus Tabelle 16 ist zu ersehen, daß die Lichtbrechung beider Tetraseren durch Melkzeit und gebrochenes Melken sich gar nicht ändert, aus Tab. 17, daß die täglichen Schwankungen, d. h. die Schwankungen von einem Tag zum andern bei derselben Melkzeit bei Milch einer Kuh im Maximum 0,8° betragen. Bei verschiedenen Kühen sind die Unterschiede naturgemäß wesentlich größer.

Tabelle 17.

Tägliche Schwankungen der Lichtbrechung des Tetraserums I und II sowie des Chlorcalciumserums der Milch von Einzelkühen.

R = Skalenteile des Zeißschen Eintauchrefraktometers bei 17,5°.

Datum Jahr 1911	Kuh E (Morgenmilch)[1] Tetraserum I R	Tetraserum II R	Chlorcalciumserum R
5. 1.	44,2	41,0	39,5
6. 1.	44,2	—	—
2. 2.	44,2	41,2	39,6
3. 2.	44,1	41,2	39,8
4. 2.	44,2	41,3	—
6. 2.	44,2	41,2	39,6
8. 2.	43,9	40,8	39,5
9. 2.	43,6	40,7	39,4
11. 2.	44,0	41,1	39,6
13. 2.	44,0	40,8	—
15. 2.	44,0	40,9	39,4
16. 2.	44,2	41,1	39,5
17. 2.	43,9	40,9	39,4
27. 2.	43,5	40,8	—
1. 3.	43,7	40,9	—
2. 3.	43,6	40,7	39,2
4. 3.	43,5	40,7	39,2
7. 3.	43,6	40,7	39,2
10. 3.	43,9	41,0	39,6
11. 3.	44,1	41,2	39,7
17. 3.	44,1	41,0	39,6
18. 3.	44,0	41,0	39,6
	Kuh A (Mittagmilch)[2]		
13. 10.	42,2	40,1	38,7
14. 10.	42,3	40,3	38,9
23. 10.	42,3	40,5	39,0
24. 10.	42,2	40,5	39,1
25. 10.	42,2	40,2	39,8
26. 10.	43,0	40,9	39,7
27. 10.	42,7	40,6	39,3
28. 10.	43,1	41,0	39,7
30. 10.	43,6	41,5	40,3

Datum Jahr 1911	Kuh A (Mittagmilch)[2] Tetraserum I R	Tetraserum II R	Chlorcalciumserum R
31. 10.	43,4	41,2	39,8
1. 11.	43,4	41,2	39,9
2. 11.	43,4	41,0	39,9
	Kuh K (Mittagmilch)[3]		
3. 11.	44,0	42,2	40,9
4. 11.	43,8	42,0	40,6
6. 11.	43,9	42,1	40,7
	Kuh N (Mittagmilch)[4]		
20. 11.	44,0	42,1	41,0
21. 11.	43,8	42,1	40,9
22. 11.	43,5	42,0	40,9
23. 11.	43,3	41,7	40,6
24. 11.	43,4	41,7	40,6
25. 11.	43,6	42,0	40,9
27. 11.	43,5	41,8	40,8
18. 12.	43,5	42,0	40,9
Jahr 1912			
4. 1.	43,6	42,1	41,0
22. 1.	43,7	42,1	41,1
	Kuh Q (Mittagmilch)[5]		
Jahr 1911			
13. 12.	42,6	40,3	38,9
14. 12.	42,7	40,4	39,0
15. 12.	42,8	40,4	39,0
16. 12.	42,8	40,5	39,2
18. 12.	42,9	40,6	39,3
19. 12.	42,7	40,5	39,2

Da die Schwankungen des Chlorcalciumserums denen der Tetraseren nahezu parallel gehen, so kann man annehmen, daß bei Sammelmilch die Tetraseren in ihrer Lichtbrechung nur denselben geringen Schwankungen unterliegen, die Mai und

[1]) Die Kuh E befand sich zu Beginn der Untersuchung im 6. Monat der Laktationsperiode.
[2]) Die Kuh A befand sich am Ende des 2. Monats der Laktationsperiode.
[3]) Die Kuh K befand sich im 5. Monat der Laktationsperiode.
[4]) Die Kuh N befand sich zu Beginn der Untersuchung im 5. Monat der Laktationsperiode.
[5]) Die Kuh Q befand sich im 5. Monat der Laktationsperiode.

Rothenfußer für das Chlorcalciumserum nachgewiesen haben. Überhaupt läßt sich nach den bisherigen Erfahrungen voraussagen, daß die Zusammensetzung und somit auch die Lichtbrechung des Tetraserums I und II bei normaler Milch höchstens nur im selben Grade abhängig von den oben erwähnten Einflüssen ist wie diejenige aller bisher benutzten Seren. Da bei ihrer Herstellung die Mängel des Spontanserums (Abbau von Milchbestandteilen), der gewöhnlichen Essigsäureseren (unkontrollierbarer Eiweißgehalt), des Chlorcalciumserums (Ausfällen von Calciumsalzen) und des Asaprolserums (zu große Verdünnung und anderes) vermieden sind, so dürfte ihre Lichtbrechung eher noch kleineren Schwankungen unterworfen sein, als man bisher bei andern Seren beobachtete.

Wesentlich größere Schwankungen der Lichtbrechung der Tetraseren und auch der andern Seren sind zu erwarten bei abnormer Milch, d. h. bei Milch von kranken Tieren oder von Tieren, die eben gekalbt haben (Kolostrum), am Ende der Laktation nicht mehr regelmäßig gemolken werden, durch schlechte Fütterung gesundheitlich heruntergekommen oder durch Brunst hochgradig erregt sind.

Der Einfluß von Krankheiten auf die in den Essigsäureseren gelösten Stoffe besteht nach übereinstimmenden Beobachtungen darin, daß die albumin- und globulinartigen Stoffe im allgemeinen stark vermehrt (bis auf das doppelte), der Milchzucker aber stark vermindert ist (bis zum Verschwinden). Auch die Aschenmenge der Milch scheint im allgemeinen um etwa 15% seines normalen Wertes erhöht und die Acidität oft stark vermindert zu sein, so daß z. B. die Milch eutertuberkulöser Tiere meistens alkalische Reaktion gegen Lackmus zeigt. Bei Eutertuberkulose hat Storch[1]), ferner Monvoisin[2]) eine wesentliche Zunahme, Seel[3]) dagegen eine Abnahme des Chlorgehaltes beobachtet. Monvoisin stellte ferner bei Eutertuberkulose eine beträchtliche Abnahme von Calcium und Phosphorsäure fest. Mezger, Fuchs und Jesser[4]) fanden bei abnormen Sekreten sowohl erhöhten als erniedrigten Chlorgehalt, ferner erniedrigten Stickstoff- und Phosphorsäuregehalt neben niedrigem Milchzucker- und erhöhtem Aschengehalt.

Bei Kolostrum und bei Milch von durch Brunst hochgradig erregten Tieren wurden ähnliche Abweichungen wie bei Milch von kranken Tieren gefunden. Auch hier ist der Gehalt an albumin- und insbesondere globulinartigen Stoffen sehr stark erhöht, der Gehalt an Milchzucker in der Regel vermindert. Die Aschenmenge wurde oft höher gefunden, als bei durch Krankheit veränderter Milch.

Auch Milch von Kühen, die am Ende der Laktation nicht mehr regelmäßig gemolken werden, enthält oft abnorme Mengen albumin- und globulinartiger Stoffe.

Entsprechend diesen wesentlichen Änderungen der Bestandteile der Essigsäureseren ist zu erwarten, daß in der Regel die Tetraseren I und II abweichende Werte der Lichtbrechung zeigen. Da aber beim Tetraserum I die durch den geringen Gehalt an Milchzucker verursachte geringere Lichtbrechung durch den erhöhten Gehalt an ge-

---

[1]) Nord. Med. Arch. **16**, Nr. 16 (1884).
[2]) Journ. de Physiol. et de Pathol. générale **12**, 50 (1910).
[3]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. **21**, 129 (1911).
[4]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. **19**, 724 (1910).

rinnbaren Eiweißstoffen ausgeglichen sein kann, so lassen sich unter Umständen auch normale Werte für dieses Serum voraussehen. Auch die Lichtbrechungswerte der von gerinnbarem Eiweiß freien Tetraseren II können dann normal ausfallen, wenn die durch den niedrigen Gehalt an Milchzucker erniedrigte Refraktion durch den erhöhten Mineralstoffgehalt kompensiert wird.

Eine derart veränderte Milch läßt sich jedoch einerseits an der abnormen, den gerinnbaren Eiweißstoffen entsprechenden Differenz der Lichtbrechung beider Tetraseren, anderseits an dem Mißverhältnis zwischen Lichtbrechung und Polarisation des Tetraserums II erkennen. Da nämlich die Polarisation nur dem Milchzucker, die Lichtbrechung der Hauptsache nach der Summe der Mineralstoffe und des Zuckers entspricht, so wird man in obigem Falle normale Lichtbrechung, aber ganz abnorme Polarisation finden. Was für die Tetraseren gilt, ist natürlich auch bei den entsprechenden Essigsäureseren zutreffend.

An einem Ziegenkolostrum konnten wir die den Eiweißstoffen entsprechende, abnorm hohe Differenz zwischen den beiden Tetraseren beobachten.

Ziegenkolostrum	Refr. des Tetraserums I	Refr. des Tetraserums II	Differenz
24 Stunden nach dem Werfen	80,3	51,3	29 (!)
72 Stunden nach dem Werfen	66,5	49,5	17 (!)
etwa 4 Wochen später . .	45,1	41,5	3,6

Ferner wurden wir zufällig durch die Beobachtung ungewöhnlich großer täglicher Schwankungen der Lichtbrechung bei den Tetraseren der Milch zweier Kühe auf die alsbald bestätigte Vermutung gebracht, daß die Kühe sich noch im Anfang der Laktation befanden. Tabelle 18 gibt die entsprechenden Messungen wieder.

Tabelle 18. Tägliche Schwankungen der Lichtbrechung der Seren der Milch von Kühen im Anfang der Laktation.

R = Skalenteile des Zeißschen Eintauchrefraktometers bei 17,5°.

Datum	Kuh P[1]) (Mittagmilch)			Datum	Kuh P (Mittagmilch)		
	Tetraserum		Chlorcalciumserum		Tetraserum		Chlorcalciumserum
Jahr 1911	I R	II R	R	Jahr 1912	I R	II R	R
6. 11.	44,1	41,6	40,2	4. 1.	43,6	41,0	39,7
7. 11.	43,6	41,2	39,8	8. 1.	43,5	41,0	39,7
8. 11.	41,4	39,2	37,9				
9. 11.	42,0	39,8	38,5		Kuh S[2]) (Mittagmilch)		
10. 11.	43,0	40,8	39,5	16. 1.	45,3	42,6	41,0
11. 11.	43,2	41,1	39,9	17. 1.	45,1	42,4	41,0
13. 11.	43,6	41,4	40,2	18. 1.	44,5	41,9	40,4
14. 11.	44,0	41,9	40,6	19. 1.	44,1	41,5	40,3
15. 11.	42,7	40,6	39,3	20. 1.	45,0	42,5	41,1
16. 11.	43,0	40,8	39,6	22. 2.	43,7	41,2	39,8
17. 11.	43,3	40,9	39,6				

[1]) Die Kuh P befand sich zu Beginn der Untersuchung im ersten Monate der Laktation (14 Tage nach dem Kalben).

[2]) Die Kuh S befand sich im ersten Monate der Laktation.

An Milch kranker Kühe die oben begründeten Vermutungen über das Verhalten der Lichtbrechung und der Polarisation der Tetraseren zu bestätigen, hatten wir bis jetzt keine Gelegenheit. Die bei gewöhnlichen albumin- und globulinfreien Essigsäureseren und beim Chlorcalciumserum gefundenen außergewöhnlichen niedrigen Werte für Lichtbrechung und Polarisation[1]), [3]), anderseits die sich widersprechenden Angaben über die Refraktion von eiweißhaltigen gewöhnlichen Essigsäureseren der Milch kranker Kühe[2]), ferner die abnormen Differenzen, die sich aus den für abnorme Milch festgestellten Werten für das spezifische Gewicht des bei 45° hergestellten Essigsäureserums und der Lichtbrechung des Chlorcalciums berechnen lassen, sprechen für die Richtigkeit obiger Ausführungen. Beim Chlorcalciumserum ist die niedrige Lichtbrechung von Milch kranker Tiere nicht bloß auf den verminderten Milchzuckergehalt, sondern auch teilweise darauf zurückzuführen, daß infolge verringerter Acidität oder Alkalität der Milch durch den Zusatz von Chlorcalcium mehr Calciumsalze ausgefällt worden als bei normaler Milch.

Nach den Angaben von Mezger, Fuchs und Jesser[3]) ist es bei der Herstellung des Chlorcalciumserums von Milch mit abnormer Zusammensetzung oft erforderlich, den Chlorcalciumzusatz auf das Doppelte zu erhöhen. Eine entsprechende Abänderung der Herstellungsvorschrift der Tetraseren durch Verdoppelung des Essigsäurezusatzes bei Milch von alkalischer Reaktion ist, wie oben erwähnt, ebenfalls vorgesehen.

Einfluß der Erhitzung.

Je nach der Temperatur und der Dauer des Erhitzens der Milch ist die Veränderung der in den Seren gelösten Stoffe eine mehr oder weniger tiefgreifende. Dabei kommt es wesentlich darauf an, ob man die Milch in offenen oder in geschlossenen Gefäßen, mit oder ohne Rührer, in nicht- oder vortemperierten Bädern oder über freier Flamme erhitzt. Bei offenen Gefäßen hat man z. B. neben Zersetzungen mit Verflüchtigung von Wasser und daher mit einer Anreicherung an den übrigen Stoffen zu rechnen.

Im allgemeinen kommen auf Grund zahlreicher Arbeiten, besonders den interessanten Versuchen von Jensen und Plattner[4]), folgende chemische Veränderungen beim Erhitzen der Milch in Betracht.

Bereits unterhalb der Gerinnungstemperatur der eiweißartigen Stoffe wird Kohlendioxyd frei, wobei sich gleichzeitig unlösliche Calciumsalze abscheiden; bei etwa 65° beginnt die Gerinnung der Eiweißstoffe, bei etwas höherer Erhitzung (z. B. $^1/_2$ Stunde auf 73°) werden auch diejenigen Stoffe vernichtet, welche die Peroxydasenreaktionen geben; bei noch höhern Temperaturen soll auch die Citronensäure z. T. zerstört werden; beim Erhitzen im geschlossenen Gefäß auf Temperaturen über 100° (z. B. $^1/_2$ Stunde auf 110° oder $^1/_4$ Stunde auf 120°) wird auch der Milchzucker und das Kasein verändert, wobei die Extraktivstoffe zunehmen.

---

[1]) Monvoisin, Journ. de Physiol. et de Pathol. générale **12**, 50 (1910); — Ackermann, Chem. Ztg. **28**, 1155 (1904).

[2]) Vergl. S. 298.

[3]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. **19**, 724 (1910).

[4]) Landw. Jahrb. der Schweiz **19**, 233 (1905).

Da die zuerst sich abscheidenden Calciumsalze bei der Herstellung der Essigsäureseren in Essigsäure oder beim Spontanserum durch die Milchsäure, beim Asaprolserum durch die Citronensäure gelöst werden, so ist vorauszusehen, daß die Lichtbrechung dieser Seren durch die unter 65° vor sich gehenden Veränderungen nicht beeinflußt wird.

Aber auch als wir einerseits frische, anderseits auf 60 und 65° erwärmte Milch zentrifugierten (wobei etwa ungelöstes Calciumcarbonat und Calciumphosphat im Bodensatz bleiben mußten) und aus den mittleren Schichten der zentrifugierten Milch das Tetraserum I herstellten, zeigte das Serum der auf 60° erhitzten Milch dieselbe Lichtbrechung wie das der frischen, und die Lichtbrechung des Serums der auf 65° erhitzten Milch war nur unwesentlich geringer. Daraus geht hervor, daß jedenfalls größere Mengen von Calciumcarbonat und Calciumphosphat durch Erwärmen der Milch bis zu 65° sich nicht abscheiden.

Die über 65° vor sich gehenden Veränderungen beeinflussen die Lichtbrechung und das spezifische Gewicht derjenigen Seren, bei deren Herstellung die albumin- und globulinartigen Stoffe nicht schon ausgefällt sind, also insbesondere die des Tetraserums I.

Die Abweichung des Tetraserums I aus erhitzter Milch von dem aus frischer Milch ist auch äußerlich daran zu erkennen, daß es beim Erhitzen über freier Flamme oder auf bestimmte Temperaturen schwächere oder nur solche Trübungen oder Fällungen gibt, die sich in der Kälte wieder lösen.

Im Tetraserum I einer größern Anzahl Proben von über 65°, aber unter 80° erhitzter Milch trat in einem auf 65° vorgewärmten Wasserbade keine Fällung mehr ein; je nach der Dauer und der Temperatur des vorangegangenen Erhitzens der Milch erhielt man im Serum bei 70° oder im siedenden Wasserbade oder über freier Flamme eine in der Kälte unlösliche Fällung oder Trübung. Genauere Mitteilungen über die Versuche, die ein Erkennen der Erhitzungsart der Milch versprechen, behalten wir uns noch vor. Bei entsprechenden eiweißhaltigen, gewöhnlichen Essigsäureseren und bei Spontanseren war wegen der opaleszierenden Eigenschaften bei 65° kein deutlicher Unterschied zwischen roher und erhitzter Milch zu sehen. In einer größern Versuchsreihe haben wir die Abnahme der Lichtbrechung des Tetraserums I beim Erhitzen der Milch beobachtet. Die Erhitzung wurde z. T. in auf bestimmte Temperatur vorgewärmten Wasserbädern, z. T. in Thermostaten vorgenommen. Konzentrationsänderungen der Seren durch Verdunstung wurden dadurch vermieden, daß die Milch in Kölbchen mit Rückflußrohren erhitzt wurden, wobei etwaiges Kondenswasser mit der Hauptmenge durch Umschütteln vereinigt wurde. Gleichzeitig mit der Beobachtung der Lichtbrechung wurde in einigen Fällen der Verlauf der Peroxydasenreaktion geprüft, wobei die von Rothenfußer[1]) empfohlene Lösung von p-Phenylendiaminchlorhydrat-Guajakol benutzt wurde. Es war erforderlich, auch das reinste p-Phenylendiaminchlorhydrat des Handels mehrfach aus 15%iger Salzsäure umzukristallisieren, um unzweideutige Reaktionen zu bekommen.

[1]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genußm. **16**, 63 (1908).

Tabelle 19. Lichtbrechung und Peroxydasenreaktion beim Tetraserum I

R = Skalenteile des Zeißschen Eintauchrefraktometers bei 17,5°. P = Ausfall der Peroxydasen-

Milch Nr.		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14	
T	Z	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P
Zimmertemperatur		40,3	+	39,7	+	42,7	+	43,7	+	43,0	+	44,2	+	43,0	+	43,2	+	44,2	+	44,3	+	44,3	+	44,0	+	44,0	+	44,0	+
60°	60′											44,1	+					44,2	+										
	120′																	44,1	+										
65°	60′							43,3	+																				
	120′															42,9	+												
	180′																												
	240′																												
	300′																												
70°	2′																												
	5′																												
	10′																												
	20′			38,7	+									42,1	+														
	25′									42,0	+																		
	40′									41,9	+																		
	60′													41,8	−														
	120′																	42,9	+										
	180′																												
75°	30′																					42,1	+						
	60′																					41,5	−						
76,5°	10′																												
	30′																									42,0	−	40,9	−
	45′																											40,8	−
	80′																							41,0	−			40,8	−
80°	1′																												
	10′																	41,4	−										
	20′									39,6	−																		
	30′	38,3	−																										
90°	20′			37,4	−																								
100°	5′									39,6	−																		
	10′	38,3	−					40,3	−									41,2	−										
	20′			37,4	−	39,9				39,6	−	41,0	−							41,3		41,3	−	41,0	−	41,9	−	40,8	−
	45′					39,9		40,3	−																				
105°	1′																												
	10′																												
	20′																												
110°	20′																												
120°	60′																												

Aus den in Tabelle 19 wiedergegebenen Versuchen ergeben sich die wichtigen Schlußfolgerungen:

1. daß bei 65° trotz sehr lang andauernden Erhitzens nur ein Teil der gerinnbaren Eiweißstoffe gefällt wird, (wahrscheinlich Globulin) und daß der zweite Teil bei andauerndem Erhitzen auf 70°, über 70° aber um so rascher koaguliert wird, je höher die Erhitzungstemperatur war;

nach dem Erhitzen der Milch auf verschiedene Temperaturen.

reaktion. T = Temperatur der Milcherhitzung. Z = Dauer der Erhitzung in Minuten.

15		16		17		18		19		20		21		22		23		24		25		26		27		28		29		30	
R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P
42,6	+	42,6	+	44,0	+	44,2	+	43,9	+	43,5	+	43,7	+	43,6	+	43,6	+	43,6	+	42,5	+	43,5	+	42,3	+	42,6	+	42,2	+	42,3	+
42,6	+									43,5	+			43,6	+																
42,6	+																														
				43,7	+															42,1	+	43,1	+								
				43,6	+					43,0	+			43,4	+					42,0	+	43,0	+								
																				42,0	+										
																				42,0	+	43,0	+								
																														42,2	+
																														42,0	+
																														41,8	+
						42,2	+	42,3	+															41,0	+	41,9	+	41,6	+	41,0	+
						41,7	+	41,6	+															40,9	—	41,4	—	41,0	—	40,6	—
																										41,2	—				
40,3	—																														
		39,6	—																												
		39,5	—																												
39,5	—	39,5	—	40,9	—	41,1	—	40,9	—	40,8	—	40,9	—	40,7	—	40,7	—							40,0	—	40,5	—	40,3	—	40,2	—
												40,9	—																		
												41,0	—	40,7	—			40,8	—												
										41,3	—					40,8	—	40,9	—												

2. daß die Peroxydasenreaktion schon negativ ausfällt, wenn noch nicht alles Eiweiß geronnen ist;

3. daß durch Erhitzen der Milch über 100° die Lichtbrechung nur unbedeutend mehr verändert wird als durch Erhitzen bis 100°. Diese letztere Beobachtung war im Hinblick auf die Versuche Jensens (vergl. S. 296), wonach der lösliche Gesamtstickstoff beim Erhitzen der Milch über 100° zunimmt, nicht zu erwarten. Vielleicht

wird einerseits durch die Zunahme der Extraktivstoffe eine Erhöhung, anderseits durch den Abbau des Milchzuckers und die Zerstörung der Citronensäure, die nach Obermeier[1]) schon bei 70° beginnen soll, eine Erniedrigung der Lichtbrechung bewirkt, so daß unter Umständen ein Ausgleich der Wirkungen zu normalen Brechungen erfolgt. Auch im Chlorcalciumserum war in der Lichtbrechung trotz längern Erhitzens der Milch über 100° keine Veränderung zu beobachten.

Einfluß von Zusätzen.

a) Zusatz von Wasser.

Es läßt sich erwarten, daß durch die Wässerung der Milch die Lichtbrechung und das spezifische Gewicht der verschiedenen Seren um so empfindlicher beeinflußt werden, je größere Mengen von Milchbestandteilen sie enthalten. Ackermann[2]) hat bereits darauf hingewiesen, daß das Spontanserum gegenüber Wasserzusätzen am empfindlichsten sei und daß er leider zur Herstellung des Chlorcalciumserums gezwungen war, alle Albuminate auszufällen, um ein Serum zu erhalten, das man nicht zu filtrieren braucht.

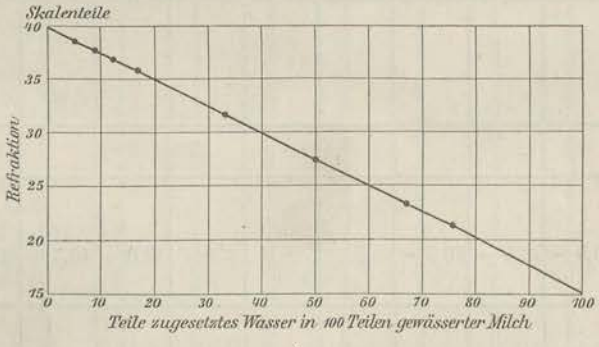
In Tabelle 20 sind die Änderungen der Lichtbrechung und des spezifischen Gewichtes der Tetraseren durch den Einfluß der Wässerung in Vergleich mit dem Spontan-, Asaprol- und Chlorcalciumserum auf Grund von vergleichenden Untersuchungen zusammengestellt. Es ist zu ersehen:

1. Daß das Tetraserum I am empfindlichsten, das Asaprolserum am unempfindlichsten ist[3]);

2. daß die Wässerung die Lichtbrechung praktisch in demselben Maße beeinflußt, wie das spezifische Gewicht, wobei durchschnittlich auf etwa 1 Skalenteil des Eintauchrefraktometers etwa 1 Laktodensimetergrad zu rechnen ist[4]). Immerhin sind die Änderungen des spezifischen Gewichtes nicht so regelmäßig, wie die der Refraktion, was vielleicht z. T. darauf zurückzuführen ist, daß die Grenze der Empfindlichkeit der Bestimmung mit dem 50 g-Pyknometer etwas früher erreicht ist, als die der Refraktion.

Fig. 2. Refraktion des Tetraserums II einer gewässerten Milch.

Refraktion des Serums der ungewässerten Milch = 40 Skalenteile
„ „ Wassers = 15 Skalenteile



[1]) Arch. f. Hyg. **50**, 53 (1904).

[2]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genußm. **16**, 588 (1908).

[3]) Ackermann kam ebenfalls zu dem Ergebnis, daß das Asaprolserum bedeutend weniger empfindlich ist als das Chlorcalciumserum; seine Berechnungen sind jedoch deshalb nicht maßgebend, weil die von ihm benutzten Zahlen für das Chlorcalciumserum sich auf Veränderung der Lichtbrechung durch Zusatz von x g Wasser zu 100 Milch beziehen, während die entsprechenden des Asaprolserums x g Wasser in 100 Mischung angeben.

[4]) Zu annähernd demselben Ergebnis kam Wiegner beim Chlorcalciumserum. Milchw. Zentralbl. **5**, 530 (1909).

Tabelle 20. Einfluß der Wässerung der Milch auf die Seren.

R = Lichtbrechung in Skalenteilen des Zeißschen Eintauchrefraktometers bei 17,5°.
d_4^{15} = Spezifisches Gewicht bei 15° bezogen auf Wasser von 4°.

Milch Nr.	Gramm zugesetztes Wasser auf 100 g Milch	Gramm zugesetztes Wasser in 100 g Mischung	Tetraserum I		Tetraserum II		Chlorcalciumserum	Spontanserum	Asaprolserum
			R	d_4^{15}	R	d_4^{15}	R	R	R
1	0	0	43,5	1,0290	41,7	1,0286	40,2	—	—
	5	4,75	42,1	1,0275	40,4	1,0271	38,9	—	—
	10	9,1	40,7	1,0258	39,2	1,0258	37,9	—	—
2	0	0	42,8	1,0284	40,1	1,0269	38,6	42,0	—
	5	4,75	41,4	1,0272	38,8	—	37,4	40,7	—
	10	9,1	40,0	1,0256	37,7	1,0242	36,3	39,4	—
3	0	0	43,3	1,0287	41,1	1,0278	39,5	—	—
	5	4,75	41,9	1,0275	39,8	1,0267	38,2	—	—
	10	9,1	40,6	1,0265	38,7	1,0254	37,1	—	—
4	0	0	44,7	1,0301	41,6	1,0283	40,1	—	—
	5	4,75	43,2	1,0283	40,2	1,0269	38,7	—	—
	10	9,1	41,9	1,0270	38,9	1,0260	37,6	—	—
5	0	0	42,1	1,0271	40,0	1,0268	38,5	—	—
	5	4,75	40,8	1,0256	38,7	1,0255	37,3	—	—
	10	9,1	39,6	1,0247	37,6	1,0249	36,3	—	—
6	0	0	42,1	—	39,7	—	—	—	37,4
	5	4,75	40,8	—	38,4	—	—	—	36,9
	10	9,1	39,6	—	37,2	—	—	—	36,5
7	0	0	42,5	—	—	—	—	41,6	—
	5	4,75	41,2	—	—	—	—	40,3	—
	10	9,1	40,0	—	—	—	—	39,1	—

Bei der graphischen Darstellung der Änderung der Lichtbrechung durch den Wasserzusatz (vgl. Fig. 2) ergibt sich eine gerade Linie, wenn man g zugesetztes Wasser in 100 g Mischung, dagegen eine Kurve, wenn man g zugesetztes Wasser auf 100 g Milch einträgt.

Die Teile zugesetzten Wassers in 100 Teilen Mischung (x) lassen sich, wie eine einfache Rechnung ergibt, mit ziemlicher Annäherung auf Grund der Formel ermitteln:

$$x = \frac{100\,(R—R')}{R—15}$$

worin R die Refraktion vor, R′ die nach der Wässerung bedeuten; die zu 100 Teilen reiner Milch zugesetzten Teile Wasser (y) lassen sich nach der Formel:

$$y = \frac{100\,(R—R')}{R'—15}$$

berechnen (vgl. Tabelle 21).

Tabelle 21. Einfluß der Wässerung auf die Lichtbrechung des Tetraserums II.

R = Lichtbrechung des ungewässerten Serums in Skalenteilen des Zeißschen Eintauchrefraktometers bei 17,5°.

R′ = Lichtbrechung des gewässerten Serums in Skalenteilen des Zeißschen Eintauchrefraktometers bei 17,5°.

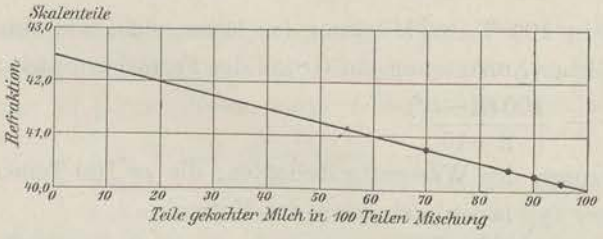
Milch Nr.	Zu 100 Teilen Milch waren zugesetzt worden Teile Wasser	Aus der Abnahme der Lichtbrechung berechnet $y = 100\frac{R-R'}{R'-15}$	In 100 Teilen Mischung waren vorhanden Teile Wasser	Aus der Abnahme der Lichtbrechung berechnet $x = 100\frac{R-R'}{R-15}$	Lichtbrechung des Tetraserums II R und R′
1	0	0	0	0	40,7
	5	5,3	4,7	5,1	39,4
	10	10,8	9,1	9,7	38,2
	15	16,3	13,0	14,0	37,1
	20	21,2	16,7	17,5	36,2
	50	50,3	33,3	33,4	32,1 [1])
	100	107	50,0	51,8	27,4 [1])
	200	199	66,7	66,6	23,6 [1])
2	0	0	0	0	40,0
	5	5,0	4,7	4,8	38,8
	10	10,1	9,1	9,2	37,8
	15	15,2	13,0	13,2	36,7
	20	19,6	16,7	16,4	35,9
	50	49,7	33,3	33,2	31,7 [1])
	100	100	50,0	50,0	27,5 [1])
	200	198	66,7	66,4	23,4 [1])
	300	297	75	74,8	21,3 [1])

b) Zusatz von gekochter Milch zu roher Milch und umgekehrt.

In Mischungen von roher und gekochter Milch ist natürlich der Gehalt an gerinnbarem Eiweiß des Tetraserums I (und des Spontanserums), somit auch deren spezifisches Gewicht und Lichtbrechung niedriger als bei reiner roher Milch.

Fig. 3. Änderung der Refraktion des Tetraserums I einer rohen Milch bei Zusatz gekochter Milch.

Refraktion der rohen Milch = 42,5 Skalenteile
„ „ gekochten Milch = 40,0 Skalenteile



Über die Empfindlichkeit der Änderung der Lichtbrechung des Tetraserums I bei Zusatz von gekochter Milch gibt die graphische Darstellung Fig. 3, welcher Versuche an einer Milch von mittlerem Albumin- und Globulingehalt zugrunde liegen, ein Bild.

[1]) Oberhalb 50% Wasserzusatz wurden zur Herstellung des Serums auf 50 ccm Milch nicht 1 ccm 20%iger Essigsäure zugesetzt, sondern entsprechend weniger, um die durch den Zusatz verursachte Refraktionserhöhung des Serums möglichst auszuschalten.

Auf die Lichtbrechung derjenigen Seren, die kein gerinnbares Eiweiß enthalten, hat der Zusatz von gekochter Milch natürlich keinen Einfluß.

Ein Zusatz schon von 1—2 % roher zugekochter Milch läßt sich im Tetraserum I dadurch erkennen, daß es beim Erhitzen über freier Flamme eine in der Kälte nicht verschwindende Trübung gibt. Auch verläuft mit einem derartigen Serum nach Neutralisation mit 0,1 n-Alkali bis zur beginnenden Phosphatfällung (vgl. S. 255) die Peroxydasenreaktion positiv. In Tabelle 22 ist das Verhalten des ursprünglichen und neutralisierten Tetraserums I von Mischungen gekochter Milch mit 1—3 % roher Milch beim Erhitzen und beim Versetzen mit Rothenfußers Reagens in Vergleich zu dem von Rothenfußer angegebenen Bleiserum wiedergegeben. Hieraus ist zu ersehen, daß das Bleiserum im Gegensatz zum Tetraserum I keine Eiweißfällung gibt und daß seine Peroxydasenreaktion nicht viel empfindlicher ist als diejenige des Tetraserums I.

Tabelle 22. Nachweis geringer Mengen roher in gekochter Milch im Tetraserum I und im Bleiserum.

Milch Nr.	In 100 Teilen gekochter Milch waren enthalten:														
	1 Teil rohe Milch					2 Teile rohe Milch					3 Teile rohe Milch				
	Trübung beim Erhitzen des		Peroxydasenreaktion des			Trübung beim Erhitzen des		Peroxydasenreaktion des			Trübung beim Erhitzen des		Peroxydasenreaktion des		
			Tetraserums I		Bleiserums			Tetraserums I		Bleiserums			Tetraserums I		Bleiserums
	Tetraserums I	Bleiserums	ohne Veränderung	nach d. Neutralisation		Tetraserums I	Bleiserums	ohne Veränderung	nach d. Neutralisation		Tetraserums I	Bleiserums	ohne Veränderung	nach d. Neutralisation	
1	sehr schwach	nicht vorhanden	negativ	ganz schwach	ganz deutlich	merklich	nicht vorhanden	deutlich	stärker	stark	deutlich	nicht vorhanden	deutlich	stärker	stark
2	„	„	„	deutlich	deutlich	„	„	„	„	„	„	„	stark	„	„
3	„	„	„	ganz schwach	„	„	„	schwach	„	„	„	„	deutlich	stark	sehr stark
4	„	„	„	„	schwach	„	„	„	„	„	„	„	stark	—	sehr stark
5	„	„	ganz schwach	„	deutlich	„	„	deutlich	„	„	„	„	deutlich	—	stark
6	„	„	negativ	„	ganz deutlich	„	„	schwach	„	deutlich	schwach	„	„	—	„
7	„	„	ganz schwach	deutlich	„	„	„	deutlich	stärker	stark	deutlich	„	„	stark	„
8	„	„	„	ganz schwach	„	„	„	„	„	„	„	„	„	„	„

Die Empfindlichkeit der gewöhnlichen bei 45 ° hergestellten Essigsäureseren gegen Zusatz von roher zu erhitzter Milch war schon deshalb geringer, weil diese Seren nicht so klar waren wie das Tetraserum I. Beim Spontanserum war außerdem zu berücksichtigen, daß das gerinnbare Eiweiß durch peptolytische Fermente verändert wird.

c) Zusatz von Stoffen zur Verdeckung der Wässerung.

Die hauptsächlichsten hierfür in Betracht kommenden Fälschungsmittel: Rohrzucker, Dextrin, Kochsalz werden in dem Serum nicht verändert und müssen daher

proportional ihrer Konzentration die Lichtbrechung und das spezifische Gewicht der Milchseren ändern. Auf Grund von Wagners Tabellen[1]) läßt es sich berechnen, daß man etwa 0,35 g Rohrzucker oder 0,3 g Kochsalz zu 100 ccm Milch mit einer mittleren Lichtbrechung von 42 Skalenteilen zusetzen muß, um eine 5%ige Wässerung zu verdecken, was durch experimentelle Versuche bestätigt wurde (vgl. Tabelle 23).

d) Konservierungsmittel.

Hydroperoxyd wird bekanntlich von roher Milch unter Entwicklung von Sauerstoff zersetzt. Es war interessant zu erfahren, inwieweit etwaige sonstige Änderungen in der Zusammensetzung der Milch infolge der oxydierenden Wirkung des Hydroperoxyds durch die Lichtbrechung des Tetraserums I und II zu erkennen seien, wenn man Hydroperoxyd in derjenigen Konzentration zur Einwirkung brachte, wie sie z. B. de Waele, Sugg und Vandevelde[2]) zur Herstellung einer absolut keimfreien Milch verwendeten, wobei das überschüssige Hydroperoxyd durch Hepin entfernt wurde. Die dahingehenden Versuche haben ergeben, daß die Lichtbrechung hierbei nicht abnimmt (s. Tabelle 23). Ferner wurde festgestellt, daß Hydroperoxyd auch in der Kälte in Konzentrationen, die es eben noch durch den Geschmack erkennen lassen, die Lichtbrechung nicht verändert und daß es selbst in Konzentrationen, wie sie bei der Konservierung der Milch zu analytischen Zwecken üblich sind, die Lichtbrechung kaum beeinflußt.

Formaldehyd reagiert bekanntlich mit Amidosäuren und daher auch mit Kasein und den albumin- und globulinartigen Stoffen. Da Kasein gegenüber Albumin in bedeutend größeren Mengen vorhanden ist, so läßt sich erwarten, daß Formaldehyd auch in Mengen, wie es zur Konservierung der Milch zu Analysenzwecken verwendet wird, der Hauptsache nach mit Kasein reagiert und daher die Brechung des Tetraserums I nicht erheblich ändert. Ein Einfluß auf die Lichtbrechung des Tetraserums II oder auf das Chlorcalciumserum war erst recht nicht anzunehmen, weil etwa entstandenes Formalineiweiß nach Trillat und Sauton[3]) beim Erhitzen ausfallen müßte. Die Versuche bestätigten die Erwartungen (vgl. Tabelle 23).

Durch den Zusatz von größern Mengen Soda zu saurer Milch bis zur neutralen Reaktion läßt sich eine verhältnismäßig kleinere Zunahme der Lichtbrechung der Seren erwarten, als durch Zusatz von Soda zu Wasser, weil im ersteren Falle Kohlendioxyd freigemacht wird. Aus der Tabelle 23 ergibt es sich, daß bei Zusatz von etwa 0,3 g Soda zu 100 ccm Milch von 16 Säuregraden eine Zunahme der Lichtbrechung des Tetraserums I um 0,9 Skalenteile stattfindet, was etwa eine Wässerung von etwa 4% verdecken könnte. Bei Zusatz von Soda bis zur alkalischen Reaktion ist beim Chlorcalciumserum zu berücksichtigen, daß hierdurch bei dessen Herstellung mehr Calciumsalze ungelöst bleiben als bei neutraler oder saurer Reaktion, so daß dessen Lichtbrechung in Vergleich zu den Essigsäureseren weniger erhöht wird.

---

[1]) Vgl. S. 249.
[2]) Zentralbl. f. Bakteriol. u. Parasitenk. **13**, 30 (1904).
[3]) Ann. chim. analyt. **11**, 205 (1906).

Tabelle 23. Einfluß von Zusätzen auf die Lichtbrechung der Tetraseren I, II und des Chlorcalciumserums.

R = Skalenteile des Zeißschen Eintauchrefraktometers bei 17,5°.
Z = Zusatz zur Milch.
G = Menge des Zusatzes in Grammen zu je 100 ccm Milch.

		Tetraserum I		Chlorcalciumserum				Tetraserum I		Tetraserum II	
		vor dem Zusatz	nach dem Zusatz	vor dem Zusatz	nach dem Zusatz			vor dem Zusatz	nach dem Zusatz	vor dem Zusatz	nach dem Zusatz
Z	G	R	R	R	R	Z	G	R	R	R	R
Rohrzucker	0,3	42,3	43,4	—	—	Formaldehyd	0,05	42,0	42,0		
„	0,3	43,1	44,2	—	—	„	0,1	42,1	42,1	39,7	39,7
„	1,0	43,0	46,8	—	—	„	0,1	43,0	42,9		
Kochsalz	0,3	42,3	43,7	—	—						
„	0,3	43,1	44,4	—	—	Wasserstoff-superoxyd	0,2	43,0	43,0		
Natriumcarbonat (wasserfrei)	0,3	42,0[1])	43,4[1])	—	—		0,1	43,2	43,2	40,8	40,8
	1,0	42,8[1])	46,0[1])	—	—	dasselbe nach Zusatz v. Hepin			43,2		40,8
Borsäure	0,3	42,2	42,8	—	—						
„	0,3	43,2	43,9	—	—						
Borax (kristall.)	0,1	42,0	42,3	—	—	Wasserstoff-superoxyd	0,1	42,5	42,4	40,1	40,1
„	0,3	42,2	43,1	—	—						
„	0,3	43,1	43,9	—	—						
Salicylsäure	0,1	44,3	44,65	40,0	40,5	dasselbe nach Zusatz v. Hepin			42,4		40,1
„	0,2	44,3	44,95	40,0	41,0						
Salicylsaures Natrium	0,075	42,0	42,25	—	—						
	0,1	44,3	44,6	40,0	40,4	Wasserstoff-superoxyd	0,1	43,1	43,1	40,6	40,6
	0,2	44,3	44,95	—	—						
Benzoesäure	0,1	44,3	44,6	40,0	40,4	dasselbe nach Zusatz v. Hepin			43,1		40,6
„	0,2	44,3	44,9	40,0	41,0						
Benzoesaures Natrium	0,1	42,0	42,3	—	—						
	0,1	42,0	42,3	—	—						
	0,1	44,3	44,6	40,0	40,4						
	0,2	44,3	45,0	—	—						

Benzoesäure und Salicylsäure und deren Natriumsalze in Mengen von 0,1 g auf 100 ccm Milch verändern die Lichtbrechung des Tetraserums I nur um etwa 0,2—0,3 Refraktometergrade. Die Beeinflussung des Chlorcalciumserums ist kaum merklich höher. Der Unterschied in der Beeinflussung der beiden Seren ist auf eine geringe Löslichkeit der Benzoe- und Salicylsäure in Tetrachlorkohlenstoff zurückzuführen.

Borax und Borsäure verändern die Lichtbrechung proportional ihrer Konzentration, beim Chlorcalciumserum ist jedoch außerdem mit dem bei Soda angegebenen Einfluß auf die Calciumsalze der Seren und daher mit einer im Verhältnis weniger erhöhten Lichtbrechung zu rechnen.

In Mengen wie sie durch den Geschmack eben noch erkannt werden, wurde für die Borsäure (0,3 g in 100 ccm) ein Brechungsunterschied des Tetrachlorkohlenstoffserums I von 0,6, für Borax von 0,8 festgestellt.

[1]) Die Milch, zu der Natriumcarbonat zugesetzt worden war, war bereits in Säuerung übergegangen.

Verwendbarkeit der Tetraseren in Vergleich zu andern Seren.

Anwendung der Tetraseren zur Prüfung auf Milchwässerung auf Grund der Lichtbrechung und des spezifischen Gewichtes.

Auf die Zweckmäßigkeit der Bestimmung des spezifischen Gewichtes des Essigsäureserums hat zuerst Dietzsch[1]) aufmerksam gemacht. Er schreibt 1884: „Wird die Milch durch einige Tropfen Essigsäure koaguliert und aufgekocht, dann von Kasein und Albumin abfiltriert, so zeigt das fast wasserhelle Serum von ganzer Milch ein spezifisches Gewicht von 1,027—1,029 usf." Man hat sehr bald eingesehen, daß diese Vorschrift zu allgemein ist, um übereinstimmende Ergebnisse im spezifischen Gewicht zu erhalten, und es wurde in der Folge eine Reihe von Vorschlägen gemacht, die die Konzentration und Menge der Essigsäure, die Höhe der Temperatur, die Zeit des Erhitzens, die Art des Filtrierens (Abkühlen vor dem Filtrieren, Zurück- oder Fortgießen der ersten Anteile usf.) näher umschreiben. Hierbei war man auf der einen Seite bestrebt, die Gerinnung der albumin- und globulinartigen Eiweißstoffe möglichst zu verhindern, auf der andern Seite brachte man absichtlich alles gerinnbare Eiweiß zur Abscheidung, weil insbesondere Reich[2]) bezweifelte, daß man alle globulin- und albuminartigen Eiweißstoffe in Lösung behalten könne. Um ja vor der Ausscheidung dieser Stoffe durch die Hitze sicher zu sein, hat die „Freie Vereinigung deutscher Nahrungsmittelchemiker" die Erhitzungstemperatur auf 40° heruntergesetzt. Trotzdem sollte es nach Bialon[3]) fraglich sein, ob nicht schon unter dieser Temperatur Eiweiß ausgeschieden werde und ob nicht diese Stoffe durch Filtration mit Papier zum Teil zurückgehalten werden. Das nach der Vorschrift der Freien Vereinigung hergestellte Essigsäureserum filtriert meistens langsam und oft trüb. Burr, Berberich und Lauterwald[4]), sowie Stüber[4]) glauben diese Schwierigkeit dadurch beseitigt zu haben, daß sie das Serum erst nach dem Abkühlen mit Eiswasser filtrieren. Die erstern bemängeln auch den erheblichen und dabei schwankenden Fettgehalt der Essigsäureseren (im Mittel 0,24%) gegenüber dem Spontanserum, das im Mittel nur 0,05% Fett enthielt.

Nach der Vorschrift von Reich[5]), die Fritzmann[6]) an Stelle derjenigen der Freien Vereinigung empfiehlt, werden zur Herstellung eines von gerinnbarem Eiweiß freien Essigsäureserums 100 ccm Milch mit 0,4 ccm Eisessig zuerst 5—6 Minuten auf 60—65°, dann nach dem Abgießen vom Kaseinfettkuchen nochmals in einem Kölbchen mit engem Hals 5—6 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt und von geronnenem Eiweiß abfiltriert usf.

Auch nach der Vorschrift von v. Raumer und Späth[7]), wonach 200—250 ccm Milch mit 2 cm 20%iger Essigsäure etwa ½ Stunde im Wasserbade unter Ersatz des verdunsteten Wassers erhitzt werden, erhielt man ein von gerinnbarem Eiweiß freies Serum.

Die nach den Vorschriften von Radulescu[8]) (10 Minuten langes Erhitzen in einem auf 75—80° erhitzten Wasserbade), nach Woodman[9]) (20 Minuten langes Erhitzen in einem auf 70° erhitzten Wasserbade), nach Fendler, Borkel und Reidemeister[10]) (Erhitzen innerhalb unbestimmter Zeit in einem auf 65—70° erhitzten Wasserbad), nach Schoorl und Con[11]) (2—5 Minuten langes Erhitzen auf 70—75°) hergestellten Seren enthalten je nach der Sorgfalt der Herstellung mehr oder weniger gerinnbares Eiweiß. Dietzsch[12]) hat seinerzeit neben dem Essigsäureserum das Spontanserum, Sambuc[13]) etwas später an Stelle des Essigsäureserums ein

---

[1]) Chem. Ztg. **8**, 323 (1884).
[2]) [5]) Milchztg. **21**, 274 (1892).
[3]) Milchw. Zentralbl. **1**, 363 (1905).
[4]) Vergl. S. 253.
[6]) Zeitschr. f. öffentl. Chem. 1898, S. 544.
[7]) Zeitschr. f. angew. Chem. 1896, S. 46 u. 70.
[8]) Mitt. a. d. pharm. Inst. u. Labor. f. ang. Chem. d. Univers. Erlangen **3**, 93 (1890).
[9]) Journ. Amer. Chem. Soc. **21**, 503 (1899).
[10]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genußm. **20**, 157 (1910).
[11]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genußm. **14**, 632 (1907).
[12]) Dietzsch, Die wichtigsten Nahrungs- und Genußmittel, 1884, S. 36.
[13]) Journ. de Pharm. et de Chim. **5**, 95 (1884); Ref. Chem. Ztg. **8**, 767 (1884).

bei 45° mit Weinsäure hergestelltes Serum, Lescoeur[1]) ein durch Einwirkung von Lab gewonnenes Serum empfohlen, und man war anfänglich der Meinung, daß die spezifischen Gewichte dieser Seren sich nicht unterscheiden, bis durch die Arbeiten von Reich[2]), Tiemann[3]), Teichert[4]), Burr, Berberich und Lauterwald[5]) die Verschiedenheit bewiesen wurde. Das Serum nach Sambuc sowie das Labserum werden zurzeit kaum in der Praxis benutzt, während das Spontanserum, trotz mehrfach geäußerter Bedenken wegen der durch Einwirkung zufälliger Kleinlebewesen veränderlichen chemischen Zusammensetzung, noch ausgedehnte Anwendung findet. Aus dem umfangreichen Analysenmaterial von v. Raumer und Späth[6]), Reinsch und Lührig[7]), Lührig[8]), Burr, Berberich und Lauterwald, Koning[9]) usw. geht nämlich hervor, daß die Werte für das spezifische Gewicht des Spontanserums trotz dessen chemischer Veränderung kaum schwanken. Reinsch und Lührig machen insbesondere darauf aufmerksam, daß trotz Veränderung der fettfreien Trockenmasse das spezifische Gewicht des-Spontanserums innerhalb dreier Tage konstant bleibt.

Auf die Zweckmäßigkeit der Bestimmung der Lichtbrechung des Essigsäureserums haben zuerst Villiers und Bertault[10]) hingewiesen. Sie benutzten ein Essigsäureserum, welches durch Zusatz des halben Volumens einer 1%igen Essigsäure zu Milch, Kochen am Rückflußkühler und Filtration hergestellt ist. Die Lichtbrechung wird mit dem Apparat von Jean und Amagat[11]) bestimmt. Die hiernach erhaltenen Zahlen entsprechen beinahe den am Eintauchrefraktometer abgelesenen, sind aber wegen abweichender Maßeinheit durchaus nicht mit diesen zu vergleichen. Das Verfahren scheint nach den Mitteilungen von Jean[11]), Basset[12]), Ducrus und Imbert[13]), Cotherau[14]) wohl in Frankreich, nicht aber in Deutschland sich eingebürgert zu haben. Es dürfte dies umso weniger bedauerlich sein, als an dem Serum die unzweckmäßig große Verdünnung, wodurch die Empfindlichkeit der Lichtbrechung gegenüber der Wässerung erheblich herabgesetzt ist, zu bemängeln ist. In Deutschland benützt man zur Bestimmung der Lichtbrechung sowohl andere Apparate als auch andere Seren. Es finden hauptsächlich folgende Apparate Verwendung: das Wollnysche Milchrefraktometer, das Refraktometer der Firma Reichert in Wien, das Abbesche Universalrefraktometer und in neuester Zeit das Zeißsche Eintauchrefraktometer, das wohl wegen seiner Handlichkeit und Empfindlichkeit (3,8 Einheiten in der 5. Dezimale = 0,1 Skalenteile, lassen sich noch genau ablesen) am meisten in Gebrauch ist.

Bei der Herstellung der Essigsäureseren zur Bestimmung der Lichtbrechung hat man außerhalb Frankreichs von der Entwicklung der Verfahren in der Bereitung der Essigsäureseren zur Bestimmung des spezifischen Gewichtes scheinbar gar keine Notiz genommen. Nur so konnte es kommen, daß in der Literatur nur von Seren die Rede ist, welche nach ihrem Herstellungsverfahren eines Teiles des gerinnbaren Eiweißes beraubt sind.

Nach Ripper[15]), der die Lichtbrechung des Essigsäureserums zuerst nur für die Prüfung auf pathologisch oder physiologisch veränderte Milch, später auch für den Nachweis der Wässerung vorschlug, existieren bereits 2 Vorschriften (!): 10 ccm Milch werden mit 5 Tropfen 20%iger Essigsäure 1—2 Minuten in einem Gefäß auf 80° erhitzt usf., und 100 ccm Milch werden mit 2 ccm 20%iger

---

[1]) Zeitschr. f. Fleisch- und Milchhyg. **4**, 241 (1896).
[2]) Milchztg. **21**, 274 (1892).
[3]) Ber. d. Versuchsstat. u. Lehranst. f. Molk. Wreschen 1903/1904.
[4]) Teichert, Methoden zur Untersuchung von Milch und Molkereiprodukten, 1909, S. 47.
[5]) Milchw. Zentralbl. **4**, 210 (1908).
[6]) Zeitschr. f. angew. Chem. 1896, S. 46 u. 70.
[7]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genußm. **13**, 280 (1907).
[8]) Molkereiztg. Hild. **22**, 1291 (1908).
[9]) Milchw. Zentralbl. **6**, 179 (1910).
[10]) Bull. Soc. chim. [3], **19**, 305 (1898).
[11]) L'Industrie Laitière **31**, 36 (1906); Ref. Milchw. Zentralbl. **2**, 470 (1906).
[12]) Bull. Soc. Pharm. Bordeaux 1904, S. 313.
[13]) Bull. Scienc. Pharm. **7**, 65 (1905).
[14]) Bull. Soc. chim. Paris [3] **33**, 234 (1905).
[15]) Wiener Landw. Ztg. 1903; Milchztg. **32**, 610 (1903).

Essigsäure 10 Minuten auf kochendem Wasserbad erhitzt, wobei sich die Milch auf etwa 65° erwärmt (!) usf. Mansfeld[1]) erhitzt 20 ccm Milch mit 4 ccm 20%iger Essigsäure im bedeckten Becherglas auf etwa 85° etwa 10 Minuten usf. Nach Versuchen von Utz[2]), der allerdings das Essigsäureserum für die Lichtbrechung nicht empfiehlt, wird die Milch am besten mit 4 ccm einer Essigsäure von der Refraktion des Spontanserums bei etwa 80° erwärmt usf. Henseval und Mullic[3]) benützen ein nach Radulescu (vgl. S. 284) hergestelltes Serum. Nach Leach[4]) erhitzt man 100 ccm Milch mit 2 ccm 20%iger Essigsäure 20 Minuten auf 70°, nach Schoorl und Con[5]) mit 14%iger Essigsäure (gleiche Refraktion wie Spontanserum) 2—5 Minuten auf 70—75°; nach Lythgoe und Nurenberg[6]) und Sleeter Bull[7]) mit 2 ccm 25%iger Essigsäure 20 Minuten auf 70° usf.

Es ist nicht zu verwundern, daß bei derartigen Vorschriften Widersprüche gegen die Anwendung der Essigsäureseren entstanden.

Rievel[8]), der das Rippersche Verfahren inbezug auf den Nachweis der Wässerung und von pathologisch veränderter Milch nachprüfte, mißt ihm gar keinen praktischen Wert bei, da die Lichtbrechung bei normaler Milch viel zu großen Schwankungen unterliege. Bialon[9]) hält es für unmöglich, eine einheitliche Regelung der Serumherstellung zu erzielen, weil man die durch Essigsäure oder Lab erhaltenen Zahlen beliebig verändern kann, je nachdem man kürzere oder längere Zeit erhitzt oder ein oder mehrere Mal filtriert. Der Grund dieser Erscheinung liege darin, daß je nach der Behandlung der Milch verschiedene Mengen Calcium, Phosphorsäure und Kasein im Serum gelöst bleiben.

Utz[10]) hält die Essigsäureseren deshalb nicht für vorteilhaft, weil die Essigsäure die Refraktion beeinflusse. Nachdem er jedoch später eine Essigsäure von derselben Brechung wie die der Spontanseren anwendet, kommt er zu dem Ergebnis, daß zwar bei normaler Milch ein Zusatz von Essigsäure keinen Einfluß auf die Refraktion ausübe, daß aber die Refraktion gewässerter Milch gegenüber dem Spontanserum vermindert wäre. Ferner bemängelt Utz, daß es beim Essigsäureserum sehr auf den Grad der Klarheit des Serums und die Temperatur der Herstellung ankäme, indem z. B. die ersten trüben Anteile eine Brechung von 1,3444, ein vollständig blankes Serum eine Brechung von 1,3441, nach dem Aufkochen aber eine Brechung von 1,3434 ergebe. In neuester Zeit wird von Mai und Rothenfußer[11]) behauptet, daß die Essigsäure zur Herstellung eines Serums zur Bestimmung der Lichtbrechung durchaus ungeeignet sei, weil ihr Lichtbrechungsvermögen von dem der Laktose zu stark abweiche, die Essigsäure nicht ohne Einwirkung auf die Milchbestandteile sei und der mit der Essigsäure in die Probe gelangte Wassergehalt die Brechung beeinflusse, ferner daß die Essigsäure mehr oder weniger tief greifende Veränderungen des Kaseins bewirke und daß man bei höherer Temperatur, wenn die Erhitzung nicht in geschlossenen Gefäßen vorgenommen werde, nie vor Verdunstungsverlusten und dadurch bewirkten Konzentrationsänderungen sicher sei.

Trotz dieser Einwände soll es indessen nach Mai und Rothenfußer möglich sein, auch bei den Essigsäureseren zu vergleichbaren Werten zu gelangen, wenn ein genau festgestelltes Herstellungsverfahren vereinbart wäre.

Wohl infolge der eben erörterten und ähnlicher, die Bedeutung der Essigsäureseren herabsetzenden Ansichten und infolge der besprochenen, zum Teil berechtigten Einwände werden zur-

---

[1]) Mansfeld, Die Unters. d. Nahr. u. Genußm., 1897, S. 17; Österr. Chem. Ztg. 8, 546 (1905).
[2]) Molk. Ztg. Hild. **16**, 109 u. 123 (1906).
[3]) Rev. génér. du Lait. **4**, 529 (1905).
[4]) Journ. Amer. Chem. Soc. **26**, 1195 (1904).
[5]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genußm. **14**, 637 (1907).
[6]) Journ. of Ind. and Eng. Chem. **1**, 38 (1909).
[7]) Journ. of Ind. and Eng. Chem. **3**, 543 (1911).
[8]) Deutsche tierärztl. Wochenschr. **13**, 133 (1905).
[9]) Milchw. Zentralbl. **1**, 363 (1905).
[10]) Österr. Chem. Ztg. **4**, 509 (1901); Milchw. Zentralbl. **1**, 209 (1905); Molk. Ztg. Hild. **16**, 119 u. 123 (1906).
[11]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genußm. **16**, 8 (1908); **18**, 737 (1909); **21**, 23 (1911); Molkereiztg. Berlin **19**, 37, 1909; Milchw. Zentralbl. **6**, 145 (1910).

zeit neben den Essigsäureseren das von Ackermann[1]) in Vorschlag gebrachte Chlorcalciumserum, ferner das von Utz empfohlene Spontanserum und das von Baier und Neumann[2]) eingeführte Asaprolserum benützt. Das vor allen andern Seren zur Bestimmung der Lichtbrechung von Jörgensen[3]) vorgeschlagene Labserum konnte jedoch keine Anhänger finden[4]), und auch das nach Baier und Neumann[5]) bei der Wollnyschen refraktometrischen Fettbestimmung erhaltene Kupferserum dürfte von untergeordneter Bedeutung sein.

In dem Umstand, daß das Chlorcalciumserum nicht erst filtriert zu werden braucht, erblicken Mai und Rothenfußer einen gar nicht hoch genug zu schätzenden Vorzug desselben, insbesondere für die Massenkontrolle der Milch. Mai und Rothenfußer zeigen ferner auf Grund sehr ausgedehnter Versuchsreihen die große Beständigkeit der Lichtbrechung dieses Serums. Die Zweckmäßigkeit des Chlorcalciumserums wird auch von anderer Seite bestätigt[6]). Lührig und Sartori[7]), sowie Benz[8]) bemängeln dagegen das Chlorcalciumserum, weil nur frische Milch damit untersucht werden könne. Mai und Rothenfußer erwidern darauf, daß Milch mit 9—12 Säuregraden allerdings ein mehr oder weniger stark trübes Chlorcalciumserum gebe, daß dessen Brechung aber trotzdem bestimmbar sei, wenn man es vorher soweit klärt, daß es genügend Licht durchläßt. Nur müsse man selbstverständlich in solchen Fällen die durch die entstandene Milchsäure verursachte Erhöhung der Brechung entsprechend berücksichtigen.

Von ganz wesentlicher Bedeutung sei beim Chlorcalciumserum der Umstand, daß jede durch Säuerung bedingte Veränderung der Milch stets eine Erhöhung der Brechung bewirke, also zugunsten des Angeschuldigten ausfalle, während das spezifische Gewicht des Spontanserums mit fortschreitender Zersetzung eher abnähme, sich also zu ungunsten des Angeschuldigten verändere.

Gegenüber Th. Henkel[9]), der auf Grund der Lichtbrechung des Chlorcalciumserums von 2093 selbst entnommenen Milchproben zur Vorsicht in der Beurteilung der Wässerung mahnt, wird von Mai und Rothenfußer der Einwand gemacht, daß es sich bei den Proben mit abnormen Lichtbrechungen offenbar um pathologisch verändertes Eutersekret handle, das selbstverständlich mit dem Begriff Milch im nahrungsmittelchemischen Sinne nichts zu tun habe.

Aus den Arbeiten von Mezger, Fuchs und Jesser[10]), Obladen[11]), Alpers[12]), Lührig[7]) geht hervor, daß die Lichtbrechung des Chlorcalciumserums insbesondere als Vorprobe zum Nachweis der Wässerung von Sammelmilch sehr brauchbar ist, daß man aber bei der Beurteilung der Wässerung von Einzelmilch sehr vorsichtig sein muß, da einerseits die Milch kranker Kühe abnorm niedrige Lichtbrechung zeigt, andererseits auch die Lichtbrechung der Milch gesunder Tiere von einem Tag zum andern erheblichen Schwankungen unterliegen kann. Lythgoe[13]) bemängelt das Chlorcalciumserum, weil es schwierig herzustellen und trübe sei.

Gegen die Bestimmung der Lichtbrechung des Spontanserums wenden sich insbesondere Burr, Berberich und Lauterwald[14]), Mai und Rothenfußer, weil die Zusammensetzung dieses Serums von dem Grade der Zersetzung abhängig und daher unkontrollierbar sei. Aus

---

[1]) Chem. Ztg. **28**, 952 u. 1155 (1904); Ber. über Jahresvers. des Ver. schweiz. analyt. Chem. 1905, S. 225; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genußm. **13**, 186 (1907); **16**, 486 (1908); Mitt. aus d. Geb. d. Lebensmittelunters. u. Hyg. **1**, 263 (1910).

[2]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genußm. **13**, 381 (1907).

[3]) Landw. Jahrb. **11**, 699 (1882).

[4]) Utz, Chem. Ztg. **30**, 844 (1906).

[5]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genußm. **3**, 644 (1900).

[6]) Vergl. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genußm. **21**, 25 (1911) und Jahresberichte der deutschen und schweizerischen Untersuchungsämter.

[7]) Jahresber. d. chem. Untersuchungsamtes d. Stadt Breslau 1908/09, S. 22 und 1911/12, S. 25.

[8]) 24. Jahresber. des Untersuchungsamtes Heilbronn 1908, S. 6.

[9]) Molk. Ztg. Berl. **18**, 613 (1908).

[10]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genußm. **19**, 720 (1910).

[11]) Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. **22**, 212 (1912).

[12]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genußm. **23**, 211 (1912).

[13]) Rep. Food and Drug Insp. Massachusets 1908, S. 37; Ref. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genußm. **23**, 497 (1912).

[14]) Milchw. Zentralbl. **4**, 224 (1908).

dem Zahlenmaterial von Burr, Berberich und Lauterwald, sowie aus den Arbeiten von Matthes und Müller[1]), Lam[2]), Lythgoe und Nurenberg[3]), Koning[4]) geht jedoch hervor, daß trotzdem die Lichtbrechung des Spontanserums, besonders innerhalb der ersten 3 Tage sehr kleinen Schwankungen unterliegt.

Das Asaprolserum läßt sich rasch und bequem herstellen und ist durch seine klare, wasserhelle Beschaffenheit ausgezeichnet. Mai und Rothenfußer, ferner Ackermann[5]) bemängeln jedoch an dem Serum, daß durch den Zusatz der Asaprollösung (vergl. S. 253) das eigentliche Milchserum zu sehr verdünnt werde, wodurch dessen Empfindlichkeit gegenüber der Wässerung herabgesetzt sei (vergl. S. 278).

Die Frage, inwieweit die Bestimmung des spezifischen Gewichtes und der Lichtbrechung nebeneinander berechtigt sind, ist besonders in neuester Zeit in den Vordergrund getreten, ohne eine Lösung gefunden zu haben.

Kreis[6]) betont als wichtige Vorzüge der Bestimmung der Lichtbrechung des Chlorcalciumserums gegenüber der bisher ausgeführten Bestimmung des spezifischen Gewichts des Essigsäure- und Spontanserums die viel raschere und einfachere Ausführbarkeit und die gleichmäßigeren Ergebnisse. Wagner[7]) weist darauf hin, daß man durch die Lichtbrechung genauere Anhaltspunkte für die Beurteilung der Milch erhält als durch die Bestimmung des spezifischen Gewichts des Essigsäureserums. Lührig und Sartori[8]) treten jedoch für die Überlegenheit der Bestimmung des spezifischen Gewichts schon aus dem Grunde ein, weil diese Bestimmung keine frische Milch voraussetzt. Ähnlich urteilt Benz[9]).

Wiegner[10]) ist auf Grund von experimentellen Versuchen und theoretischen Erwägungen zu dem Ergebnis gekommen, daß die Bestimmung von spezifischem Gewicht und Lichtbrechung beim Chlorcalciumserum wissenschaftlich gleichberechtigt seien, und hat für die gegenseitige Umrechnung Formeln angegeben, deren Richtigkeit von Ackermann[11]) bestätigt wurde. Auch Mai und Rothenfußer[12]) haben schon früher auf die theoretische Gleichwertigkeit der Lichtbrechung und des spezifischen Gewichts des Chlorcalciumserums hingewiesen, betonen indessen den praktischen Vorzug der viel weniger umständlichen Bestimmung der Lichtbrechung. Die von Wiegner bewiesene theoretische Gleichwertigkeit der Bestimmungen gelte nur für das Chlorcalciumserum, und es gehe nicht an, die Lichtbrechung des Chlorcalciumserums mit dem spezifischen Gewicht eines durch freiwilliges Gerinnen der Milch, durch Lab oder durch Zusatz von Essigsäure oder Milchsäure gewonnenen Serums in Beziehung zu bringen.

Fendler, Borkel und Reidemeister[13]) veröffentlichen vergleichende Messungen des spezifischen Gewichts des bei 45° hergestellten Essigsäureserums und der Lichtbrechung des Chlorcalciumserums derselben Milchproben. Aus der Zusammenstellung geht hervor, daß diese Werte nicht gleichberechtigt sind. Sleeter Bull[14]) hat die Lichtbrechung und das spezifische Gewicht eines Essigsäureserums gemessen und kommt zu dem Ergebnis, daß beide Bestimmungen

---

[1]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genußm. **5**, 1037 (1902); Arch. d. Pharm. **4**, 241 (1903); Zeitschr. f. analyt. Chem. **43**, 74 (1904); Zeitschr. f. öffentl. Chemt. **9**, 173 (1903); **11**, 62 (1905).

[2]) Rev. intern. falsif. **17**, 159 (1904); Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genußm. **3**, 521 (1910); Chem. Ztg. **27**, 280 (1903).

[3]) Journ. of Ind. and Eng. Chem. **1**, 38 (1909).

[4]) Milchw. Zentralbl. **6**, 179 (1910).

[5]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genußm. **16**, 586 (1909).

[6]) Ber. über die Tätigk. des kantonalen chem. Laborat. Basel 1907, S. 34.

[7]) Ber. über die Tätigk. d. öffentl. Nahrungsm.-Unters.-Amtes f. d. Fürstentum Schwarzburg-Sondershausen 1907/09, S. 22.

[8]) Jahresber. des chem. Unters.-Amtes der Stadt Breslau 1908/09, S. 22.

[9]) Jahresber. d. Unters.-Amtes Heilbronn 1908, S. 6.

[10]) Milchw. Zentralbl. **5**, 473 u. 521 (1909).

[11]) Mitteil. aus d. Geb. d. Lebensmittelunters. u. Hyg. **1**, 263 (1910).

[12]) Milchw. Zentralbl. **6**, 145 (1910).

[13]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genußm. **20**, 156 (1910).

[14]) Journ. of Ind. and Eng. Chem. **3**, 543 (1911).

wichtig seien, da oft auf Grund des spezifischen Gewichts eine Wässerung festgestellt werden konnte, während dies mit der Lichtbrechung nicht möglich war, und umgekehrt. Ackermann[1]) stellte an verschiedenen Milchproben bei gleicher Refraktion des Chlorcalciumserums verschiedene spezifische Gewichte des Essigsäureserums fest. Er schließt hieraus, daß das Essigsäureserum eine sehr schwankende Zusammensetzung habe, und begründet damit die Streichung der Bestimmung des spezifihen Gewichts des Essigsäureserums aus dem Schweizerischen Lebensmittelbuch.

Durch die Anwendung der Tetraseren werden nun die bei den bisherigen Seren gerügten Mängel und Widersprüche beseitigt. Außerdem bieten sich bei Anwendung der Tetraseren I und II nebeneinander neue Gesichtspunkte zur richtigen Beurteilung der Milchwässerung und zur Vereinfachung in der Gesamtanalyse der Milch, da andere Seren hiermit entbehrlich werden.

Wie oben gezeigt wurde, sind beide Tetraseren rasch mit oder ohne Filtration herstellbar, so daß sie sich zur Massenkontrolle sehr gut eignen. Während beim Chlorcalciumserum die geringsten Abweichungen in der Menge des zugesetzten Chlorcalciums Abweichungen in der Lichtbrechung verursachen, ist dies bei Abweichungen in der Menge der zugesetzten Essigsäure bei den Tetraseren nicht der Fall. Zum Unterschied von allen bisherigen Seren sind beide Tetraseren praktisch fettfrei und immer so klar, daß die Refraktion mit großer Schärfe bestimmt werden kann. Da die Mängel der Herstellung der andern Seren vermieden sind (vergl. S. 272), so dürfte die Lichtbrechung der Tetraseren bei normaler Milch eher kleineren Schwankungen unterliegen als die bisher beobachtete der andern Seren.

Auf Grund der chemischen Zusammensetzung der verschiedenen Seren läßt sich voraussagen, daß die Tetraseren von den bei normaler Milch in Betracht kommenden Schwankungen höchstens im gleichen Grade beeinflußt werden wie die bisher gebräuchlichen Seren.

Durch eigene Versuche wurde gezeigt, daß die Tetraseren durch Melkzeit und Melkart ebenso wenig beeinflußt werden wie das Chlorcalciumserum. Auch die täglichen Schwankungen von Einzelmilch sind nach unsern Erfahrungen mindestens ebenso gering wie beim Chlorcalciumserum.

Das Altern der Milch hat keinen Einfluß auf die Herstellung der Tetraseren (im Gegensatz zum Chlorcalciumserum); die Lichtbrechung ändert sich dabei nur unwesentlich.

Formaldehyd, Hydroperoxyd, Salicylsäure, Benzoesäure und deren Salze in Mengen bis zu 0,1 g auf 100 ccm Milch haben keinen oder einen geringen Einfluß auf die Lichtbrechung der Tetraseren. Auch größere zu Analysenzwecken verwendete Mengen von Formaldehyd oder Hydroperoxyd beeinflussen die Lichtbrechung der Tetraseren unwesentlich.

Zur allgemeinen Prüfung auf Wässerung kommt zunächst die Lichtbrechung des Tetraserums I in Betracht und zwar aus folgenden Gründen:

1. Das Tetraserum I ist bei gewöhnlicher Temperatur herstellbar.

2. Die Lichtbrechung des Tetraserums I entspricht der fett- und kaseinfreien Trockenmasse, die nach Cornalba[2]) die geringsten Schwankungen von allen

[1]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genußm. **22**, 405 (1911).

[2]) Rev. gén. du Lait **7**, 33 und 56 (1908).

analytischen Werten der Milch zeigt, genauer als die Lichtbrechung der bisherigen Seren.

3. Die Lichtbrechung des Tetraserums I wird durch die Wässerung empfindlicher beeinflußt als alle von Albumin und Globulin zum Teil oder ganz befreiten Seren.

Da der Unterschied zwischen Lichtbrechung des Tetraserums I und des Chlorcalciumserums durchschnittlich etwa 3,5° beträgt, so wird die Lichtbrechung des Tetraserums I von Mischmilch voraussichtlich etwa zwischen 41,5 und 43,5 Skalenteilen des Eintauchrefraktometers schwanken, wenn man die von Mai und Rothenfußer für das Chlorcalciumserum angegebenen Werte zugrunde legt.

Zur Beurteilung, ob nicht solche Umstände vorliegen, die eine Wässerung entweder vortäuschen oder verdecken, kann nun das Tetraserum II neben dem Tetraserum I in folgender Weise herangezogen werden.

1. Eine vorangegangene Erhitzung der Milch oder eines Teiles davon macht sich durch die geringe Differenz der Lichtbrechung der Seren I und II (vgl. S. 275), durch die Eiweißgerinnungsprüfung und die Peroxydasenreaktion (S. 281) des Tetraserums I kenntlich.

2. Täuschende Zusätze wie Kochsalz, Soda, Borat, Rohrzucker, Zuckerkalk lassen sich im Tetraserum II nachweisen (vgl. S. 301).

3. Die Gegenwart von Kolostrum oder von sonst physiologisch oder pathologisch veränderter Milch macht sich durch die abnorm große Differenz der Lichtbrechung beider Seren bemerkbar; auch ist in solchen Fällen vielfach die Refraktion und Polarisation des Tetraserums II ungewöhnlich niedrig (vgl. S. 297 und 272).

Die Bestimmung des spezifischen Gewichts neben der Refraktion ist entbehrlich, weil das spezifische Gewicht bei normaler Milch der Lichtbrechung völlig gleichwertig, aber seine Bestimmung für die Praxis viel umständlicher ist. Zur Beurteilung aber, ob pathologisch oder physiologisch veränderte oder erhitzte Milch eine Wässerung vortäuscht oder verdeckt, ist die Bestimmung des spezifischen Gewichts deshalb weniger geeignet, weil durch das gerinnbare Eiweiß das spezifische Gewicht um die Hälfte weniger empfindlich beeinflußt wird als die Lichtbrechung.

Bei geronnener Milch hätte die Herstellung des Tetraserums I keinen besonderen Vorteil. Es wurde gezeigt, daß die Lichtbrechung des Spontanserums bei nicht länger als 3 Tage geronnener Milch sich im Mittel etwa um 0,9° von der des Tetraserums I unterscheidet. Für die Beurteilung, ob erhitzte oder pathologisch oder physiologisch veränderte Milch vorliegt, ist jedoch die Lichtbrechungsdifferenz des erhitzten und nicht erhitzten Spontanserums nicht immer maßgebend, da das gerinnbare Eiweiß im Spontanserum bereits verändert ist.

Anwendung der Tetraseren zur Prüfung auf Nitrate, Nitrite und Ammoniak.

Zur Prüfung auf durch Wässerung in die Milch gelangte Nitrate wird zurzeit wohl am häufigsten die bekannte Diphenylaminreaktion benützt. Wenn auch vereinzelte Chemiker[1]) glaubten, daß die Reaktion geradeso gut mit

[1]) Szilasi, Rep. f. analyt. Chem. 6, 436 (1886). — Reiß, Pharm. Ztg. 49, 608 (1904).

Milch wie mit Milchseren ausführbar sei, so hat man sich doch meist für die Anwendung von Milchseren entschieden.

Die Ansichten über den Wert der Diphenylaminreaktion haben sich mit der Zeit wesentlich geändert, während die Technik der Ausführung der Probe sowie der Bereitung der hierzu benutzten Milchseren erheblich verbessert wurde. Die Literatur dieser Entwicklung hat Tillmans[1]) in neuester Zeit zusammengestellt. Wir möchten nur hinzufügen, daß nicht Soxhlet, sondern Uffelmann[2]) zuerst die Diphenylaminprobe vorgeschlagen hat, wobei er ein mit Essigsäure hergestelltes Serum benützte.

Was den Wert der Diphenylaminprobe anbelangt, so können wir aus den bis jetzt vorliegenden Arbeiten schließen:

1. daß durch Fütterung von nitrathaltigen Futtermitteln bei normalen, gesunden Kühen Nitrate nicht in die Milch gelangen;

2. daß durch Auswaschen der Milchgefäße mit stark nitrathaltigem Wasser die Diphenylaminreaktion der Milch zwar positiv ausfallen kann, daß aber dann, wie Rothenfußer[3]) zeigte, das Wasser zum Genuß untauglich und die damit verschmutzte Milch als verdorben anzusehen ist;

3. daß auch durch Milchschmutz die Diphenylaminreaktion ausgelöst werden kann, jedoch nur bei derartigen Mengen, daß die Milch ebenfalls als verdorben gelten muß;

4. daß bei Anwesenheit auch anderer anorganischer oxydierender Stoffe z. B. Eisenchlorid, Kaliumdichromat, Hydroperoxyd die Diphenylaminreaktion positiv verläuft.

Der Wert der Reaktion liegt daher nicht im Nachweis von gewässerter Milch, sondern darin, daß man beim positiven Ausfall der Reaktion schließen kann, daß die Milch entweder mit nitrathaltigem Wasser oder mit oxydierenden Konservierungsmitteln versetzt und daher verfälscht oder mit zum Genuß untauglichem Wasser oder mit Schmutz derart verunreinigt ist, daß sie als verdorben beanstandet werden muß.

Was hiervon zutreffend ist, muß gegebenenfalls eine eingehendere Untersuchung erweisen. Zweifellos wird es hierbei sehr zweckmäßig sein, nach dem Vorschlage von Tillmans die Menge der Nitrate quantitativ zu bestimmen; noch wichtiger aber halten wir die bereits von Uffelmann empfohlenen Ergänzungsproben der Nitratreaktion, welche auf dem Nachweis von Ammoniak und Nitrit im Essigsäureserum beruhen.

Um die Technik der Diphenylaminreaktion und der Herstellung eines geeigneten Serums hat sich wohl Tillmans am meisten verdient gemacht. Er hat in einer gründlichen Arbeit gezeigt, daß es hierbei auf die Verwendung von nicht filtrierten und von chlorhaltigen Seren ankommt, ferner darf das Serum weder Fett noch Eiweißstoffe enthalten. Er unterzieht daher ein nach Ackermann hergestelltes Chlorcalciumserum einer nachträglichen Behandlung mit Äther und Kalkmilch. Hierdurch und durch die Anwendung einer zweckmäßigen Konzentration der Schwefelsäure, bei welcher der durch die Oxydation aus dem Diphenylanim entstehende Farbstoff nicht verändert wird, gelang es Tillmans, noch 0,25 mg N_2O_5 in 1 l Milch nachzuweisen und die Reaktion als Grundlage einer kolorimetrischen Bestimmung auszuarbeiten.

In neuster Zeit wird von Tillmans und Splittgerber[4]) an Stelle des mit Äther und Kalkmilch behandelten Chlorcalciumserums ein mit Quecksilberchlorid hergestelltes Milchserum angegeben, das sich zur Massenkontrolle der Milch besser eignen soll. Hiernach werden 25 ccm Milch mit 25 ccm einer Mischung von 5%igem Quecksilberchlorid und einer 2%igen Salzsäure versetzt, geschüttelt und filtriert(!). Zur Vorprobe auf Nitrate glaubt ferner Tillmans[5]) die Serumbereitung zu erübrigen, wenn 5 ccm Milch mit 15–20 ccm seiner Diphenylaminlösung geschüttelt und die entstehenden Färbungen beobachtet werden. Wenn hiernach in 3—5 Minuten eine grüne Färbung entsteht, so sind mehr als 3 mg N_2O_5 in 1 l Milch enthalten. Da 1—2 mg durch das Spülen der Gefäße in Milch gelangen könnten, so sieht Tillmans in der geringeren Empfindlichkeit des Verfahrens einen Vorteil zum Nachweis der Wässerung.

---

[1]) Zeitschr. f. Unt. d. Nahr.- u. Genußm. **20**, 676 (1910).
[2]) Deutsche Vierteljahrsschrift f. öff. Gesundheitspflege **15**, 663 (1883).
[3]) Zeitschr. f. Unt. d. Nahr- u. Genußm. **18**, 353 (1909).
[4]) Zeitschr. f. Unt. d. Nahr.- u. Genußm. **22**, 401 (1911).
[5]) Chem. Ztg. **36**, 81 (1912).

Da nun das von uns hergestellte von gerinnbarem Eiweiß freie Essigsäureserum (Tetraserum II) nicht filtriert zu werden braucht, da es ferner kein Fett und etwas weniger Eiweiß als das Chlorcalciumserum enthält, war anzunehmen, daß es zur Diphenylaminprobe ebenso gut oder noch besser geeignet sei als das nach Tillmans bearbeitete Chlorcalciumserum.

Tabelle 24. Nachweis von Nitraten und Nitriten in den Tetraseren.

a) Nitrate mittels der Diphenylaminreaktion im Tetraserum II.

Milch	1 l Milch enthielt mg NO_3					
Nr.	5	2	1	0,5	0,25	0,1
1	momentane Reaktion sehr stark	Reaktion sehr stark	Reaktion stark	Reaktion deutlich	Reaktion schwach	Reaktion negativ
2	„	„	„	„	„	„
3	„	„	„	„	„	„
4	„	„	„	„	„	„
5	„	„	„	„	„	„
6	„	„	„	„	„	„
7	„	„	„	„	„	„
8	„	„	„	„	„	„
9	„	„	„	„	„	„
10	„	„	„	„	„	„

b) Nitrite mittels der Reaktion nach Grieß-Lunge (Sulfanilsäure + α Naphthylamin) im Tetraserum I.

Milch	1 l Milch enthielt mg NO_2			
Nr.	1	0,1	0,01	0,001
1	Reaktion sehr stark	Reaktion sehr stark	Reaktion stark	Reaktion sichtbar
2	„	„	„	„
3	„	„	„	„
4	„	„	„	„
5	„	„	„	„

In der Tat wurde durch die in Tabelle 24 aufgenommenen Versuchen festgestellt, daß im Tetraserum II die Nitrate bis zu der von Tillmans angegebenen Verdünnung noch scharf nachgewiesen werden können, wenn man je 2 ccm Serum und Diphenylaminlösung nach Tillmans in Arbeit nimmt. Versuche über die quantitative Bestimmung der Nitrate im Tetraserum II nach dem von Tillmans für das Chlorcalciumserum ausgearbeiteten Verfahren sind vorgesehen.

Wie bereits erwähnt wurde, hat Uffelmann gleichzeitig mit der Diphenylaminreaktion im Essigsäureserum auch den Nachweis von Nitriten und Ammoniak verbunden, um durch die Anwesenheit dieser Stoffe, die er in normaler Milch nicht finden konnte, geringste Mengen von gesundheitsgefährlichem verdorbenem Wasser nachzuweisen.

Da außer Uffelmann auch Trillat und Sauton[1]), Berg und Sherman[2]) in reinlich gemolkener Milch kein Ammoniak finden konnten, da ferner die Abwesenheit von Nitriten auf Grund des negativen Ausfalles der bekannten Diazoreaktionen durch die Arbeiten von Uffelmann, Riegler[3]), Wefers und Bettink[4]) und auch dadurch erwiesen scheint, daß die gegen Spuren von Nitriten empfindliche Diphenylaminreaktion in normaler Milch negativ verläuft, da endlich gefunden wurde, daß beim Verderben der Milch durch peptonisierende Bakterien Ammoniak entsteht[5]), so halten wir diese Reaktionen für ebenso wichtig wie die Nitratprobe. Die Prüfung auf Ammoniak wird insbesondere da zweckmäßig sein, wo es sich um den Nachweis von sterilisierter verdorbener Milch handelt, bei der sich bekanntlich die peptonisierenden Bakterien infolge der Abtötung der andern Keime am besten entwickeln[6]).

Uffelmann verfährt bei der Herstellung des Essigsäureserums und der Ausführung der Reaktionen folgendermaßen:

Etwa 350 ccm Milch werden mit soviel verdünnter Essigsäure versetzt, als zur Gerinnung erforderlich ist, und filtriert. Von dem Filtrat dienen 100 ccm zum Nachweis von Ammoniak, 60 zum Nachweis von Nitriten und der Rest zum Nachweis von Nitraten. Zum Nachweis von Ammoniak werden 50 ccm des Filtrates mit 3 Tropfen Salzsäure aufgekocht und filtriert. In einem Teile dieses zweiten Filtrats werden die alkalischen Erden und das Acidalbumin durch Neutralisation mit Natronlauge, in dem andern Anteil mit Kalilauge und Carbonat ausgefällt. Von der in dem ersten Anteil erhaltenen Fällung gießt man ab und prüft mit Neßlerreagens; die in dem zweiten Anteil erhaltene Fällung wird abfiltriert, worauf man destilliert und im Destillat mit Neßlerreagens auf Ammoniak prüft. Zum Nachweis von Nitrit werden die obigen 60 ccm Filtrat ohne Salzsäure gekocht, filtriert und ein Teil des Filtrats mit Diamidobenzol, der andere mit Jodzinkstärkelösung geprüft.

Zum Nachweis von Nitrit versetzt Riegler[7]) 20 ccm Milch mit einem Tropfen einer Mischung aus gleichen Teilen Naphthionsäure und β-Naphthol sowie mit 5 Tropfen Salzsäure, schüttelt eine Minute und gibt 1—2 ccm konzentriertes Ammoniak zu. Bei Anwesenheit von Nitriten tritt eine rote oder rosarote Färbung auf.

Da Wefers und Bettink[8]) in einer mit 20 % eines nitrathaltigen Wassers versetzten Milch nach dem Verfahren von Riegler Nitrit nicht nachweisen konnte, änderte er dieses in folgender Weise ab: 20 ccm Milch werden mit 12 Tropfen starker Salzsäure versetzt, kräftig geschütttelt, die geronnene Masse filtriert, das klare Filtrat mit 50 mg einer Naphthol-Naphthionsäure-Mischung versetzt, eine Minute kräftig geschüttelt und dann 2 ccm Ammoniak zugefügt, der Niederschlag filtriert, mit starkem Alkohol ausgezogen; Rotfärbung des Alkohols läßt auf Nitrit schließen.

Einfacher und zweckmäßiger als bisher gestaltet sich nun die Ausführung der Nitritreaktion, wenn an Stelle der bisherigen Seren das Tetraserum I verwendet wird, da dieses Serum klar ist und bei gewöhnlicher Temperatur erhalten wird, so daß eine Zersetzung der Nitrite durch etwa anwesendes Ammoniak oder Amidosäuren nicht zu befürchten ist. Als zweckmäßiges Diazoreagens hat sich hierbei eine von Lunge und Lwoff[9]) angegebene Lösung erwiesen: 0,1 g reines Naphthylamin, 5 ccm Eisessig, 200 ccm Wasser und 1 g Sulfanilsäure.

Die von Wefers und Bettink angegebene, umständliche Behandlung des Azoproduktes ist hierbei nicht erforderlich. Aus Tabelle 24 geht hervor, daß man mit

[1]) Revue génér. du Lait **4**, 542 (1905).

[2]) Journ. Amer. Chem. Soc. **27**, 601 (1905).

[3]) [7]) Pharm. Zentralhalle **38**, 223 (1897).

[4]) [8]) Niederl. Tijdschr. Pharm. Chem. en Toxicol. **13**, 67 (1901); Ref. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. **4**, 897 (1901).

[5]) Whitman und Sherman, Journ. Amer. Chem. Soc. **30**, 1288 (1908). — Löffler, Berliner klin. Wochenschr. **24**, 655 (1887).

[6]) Literaturzusammenstellung u. Versuche siehe besonders bei Knüsel, Studien über die sogenannte sterilisierte Milch des Handels, In.-Dissertation, Berlin (1908).

[9]) Zeitschr. f. angew. Chem. 1894, S. 348; 1906, S. 283.

der Lunge-Lwoffschen Lösung im Tetraserum I noch 0,01 mg NO_2 in 1 l Milch mit Sicherheit erkennen kann.

Zur Prüfung auf Ammoniak mit dem Neßlerschen Reagens hat sich weder das nach Uffelmann hergestellte Essigsäureserum noch unser Tetraserum II als geeignet erwiesen, und zwar deshalb, weil dieses Reagens von dem in den Seren enthaltenen Milchzucker in kurzer Zeit reduziert wird, wodurch die Ammoniakreaktion sehr undeutlich zu sehen ist. Es ist jedoch zu erwarten, daß es gelingen wird, im Tetraserum II Ammoniak nachzuweisen, wenn eine Reaktionsflüssigkeit verwendet wird, die weder von Milchzucker noch von dem im Tetraserum II enthaltenen Eiweißrest beeinflußt wird. Mit Versuchen in dieser Richtung sind wir zurzeit noch beschäftigt.

Anwendung der Tetraseren zum Nachweis von erhitzter Milch.

Vieth[1]) und Soxhlet[2]) dürften zuerst ein albumin- und globulinhaltiges Essigsäureserum zum Nachweis von erhitzter Milch empfohlen haben. Nach Soxhlet wird die Milch mit soviel Essigsäure versetzt, wie eben zur Ausfällung des Kaseins und zur Erzielung eines klaren Filtrates notwendig ist. Das Filtrat von ungekochter Milch gibt nach dem Aufkochen einen flockigen Niederschlag von Milchalbumin, während das von gekochter Milch nur opalisierend wird. Weber[3]) fand, daß hiernach hergestellte Essigsäureseren von Milch, die auf 30°, 40°, 50°, 60°, 75° erhitzt war, stets ein reichliches Koagulum von Albumin erkennen ließen; Milch, die auf 80°, 85°, 90° erhitzt war, ergab dagegen in dem zum Sieden erhitzten klaren Filtrat eine kaum merkliche Trübung, aber keine Albuminausscheidung. Der Unterschied gegen rohe Milch trat trotzdem deutlich hervor; in Milch, die auf 100° erhitzt war, ließ sich selbst nach wiederholtem Erhitzen des klaren Filtrates keine Spur einer Trübung feststellen.

Bernstein[4]) gibt eine genauere Vorschrift zur Herstellung des Essigsäureserums. Auf 50 ccm Milch werden hiernach 4,5 ccm n-Essigsäure verwendet. Serum von Milch, welche unter 70° kurze Zeit erhitzt war, gab bei 90° noch ein reichliches Koagulum.

Seligmann[5]) verdünnt 0,5 ccm verschiedenartig erhitzte Milch mit 25 ccm Wasser und setzt einen Tropfen 25%ige Essigsäure zu; beim Erhitzen des Serums ergab sich folgendes:

	1 Min.	5 Min.	10 Min.	15 Min.	30 Min.	1 h	2 h	3 h	4 h
72°	+	+	+	+	+	+	+	+	+
75°	+	+	+	+	+	±	±	—	—
79°	+	+	+	+	+	±	±	—	—
81°	±	±	—	—					
82°	±	±	—	—					
83°	±	±	—						
85°	±	—							
86°	—	—							

° Temperatur, Min. Minuten, h Stunden der Milcherhitzung; + deutliche, ± schwache, ± sehr schwache, — keine Trübung des Serums beim Erhitzen.

---

[1]) Jahresber. des milchw. Inst. Hameln 1895, S. 27.

[2]) Stohmann, Milch- und Molkereiprodukte, 1898, S. 338.

[3]) In.-Dissert. Leipzig 1902; Milchztg. **31**, 657 (1902); Zeitschr. f. Fleisch- und Milchhyg. **13**, 84 u. 112 (1903).

[4]) Zeitschr. f. Fleisch- und Milchhyg. **11**, 80 (1901).

[5]) Zeitschr. f. angew. Chem. 1906, S. 1510.

Nach Kroon[1]) eignet sich folgendes Essigsäureserum zum Nachweis von pasteurisierter und gekochter Milch am besten: 15 ccm Milch werden mit 5—10 Tropfen 30%iger Essigsäure versetzt und so lange auf 35° erwärmt, bis völlige Abscheidung erfolgt ist. Das hiernach erhaltene, stets etwas opalisierende Filtrat wird beim Erhitzen trübe, wenn die Milch kurze Zeit nicht höher als auf 85° erhitzt war, und zwar um so trüber, je niedriger die Temperatur der Erhitzung war. Nach 1, 5, 10, 20, 30 Minuten langem Erhitzen auf 70° und 80° wurden auch noch Trübungen erhalten; wenn jedoch mehr als ½ Stunde auf 80° erhitzt wurde, blieb das Filtrat klar. Bei Anwendung von 20%iger Essigsäure blieb die Trübung schon nach dem Erhitzen auf 75° aus.

Über die Empfindlichkeit dieser Eiweißprobe zum Nachweis der Milcherhitzung bei Seuchengefahr, wo es sich darum handelt, nicht nur die Höhe der Erhitzungstemperatur, sondern auch nachträgliche Zusätze oder Verunreinigungen mit roher Milch nachzuweisen, sind bis jetzt keine eingehenden Angaben zu finden.

Vermutlich waren die bisherigen Essigsäureseren wegen ihrer opalisierenden oder trüben Beschaffenheit nicht geeignet, noch die durch etwa 3% rohe Milch verursachte Trübung zu erkennen.

Zur einigermaßen sicheren Bestimmung der Erhitzungsart von pasteurisierter Milch oder zum Nachweis von Mischungen roher Milch mit erhitzter Milch mit den Essigsäureseren war man bisher darauf angewiesen, hierin eine quantitative Bestimmung der albumin- und globulinartigen Stoffe entweder durch Gerinnung nach Hoppe-Seyler[2]) oder durch Fällung mit Gerbsäure nach Sebelien[3]) auszuführen (vergl. Seite 298).

Steiner[4]) erhielt in dem nach Hoppe-Seyler bereiteten Essigsäureserum je nach der Höhe der Temperatur und der Zeit des Erhitzens folgende Mengen mit Gerbsäure fällbarer Eiweißstoffe:

Erhitzungsart	Gesamtalbumin in 100 g Milch	% der Abnahme des Albumins
nicht pasteurisiert	0,2719 g	—
25 Min. 60°	0,3125 „	—
20 „ 70°	0,2581 „	6,9
5 „ 80°	0,1227 „	55,7
10 „ 90°	0,0656 „	67,5
5 „ 95°	0,0592 „	78,6
3 „ 100°	0,0538 „	82,5

Von Stewart[5]), der im Serum nach Hoppe-Seyler das gerinnbare Eiweiß bestimmte, rührt die nachfolgende Tabelle her:

Lösliches Albumin in 100 g frischer Milch	Erhitzungsart	Lösliches Albumin in 100 g erhitzter Milch
0,423 g	10 Min. 60°	0,418 g
0,435 „	30 „ 60°	0,427 „
0,395 „	10 „ 65°	0,362 „
0,395 „	30 „ 65°	0,333 „
0,422 „	10 „ 70°	0,269 „
0,421 „	30 „ 70°	0,253 „
0,380 „	20 „ 75°	0,07 „
0,380 „	30 „ 75°	0,05 „
0,375 „	10 „ 80°	0,00 „
0,375 „	30 „ 80°	0,00 „

[1]) Landbouwkundig Tijdschrift **12**, 51 (1904); Ref. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- und Genußmittel **9**, 160 (1905).

[2]) Zeitschr. f. physiolog. Chem. **9**, 246 (1884/85).

[3]) Zeitschr. f. physiolog. Chem. **13**, 143 (1889).

[4]) Molkereiztg. Hildesh. **15**, 402 (1901); Milchztg. **30**, 401 u. 435 (1901).

[5]) Leffmann und Beam, Food Analysis, 1901, S. 224.

Jensen und Plattner[1]) haben Milch kurze Zeit auf 75°, 80°, 90°, dann 5 Minuten, ¼, ½, 2 Stunden auf 50°, 60°, 70°, 75°, 77°, 77,5°, 80°, 90°, 100°, 110°, 120°, 130°, 140°, und 5 Stunden auf 50°, 60°, 70° erhitzt und im Essigsäureserum den gerinnbaren Stickstoff bestimmt. Aus den umfangreichen Tabellen geht hervor, daß schon bei 60° ein Teil des Albumins gerinnt, wenn die Milch 5 Stunden bei dieser Temperatur erhitzt wird, daß aber größere Mengen erst bei 70—75° ausgeschieden werden und die Milch 1 Stunde auf 77,5°, ½ Stunde auf 80° oder 5 Minuten auf 90° erwärmt werden muß, um das Albumin vollständig zu koagulieren. Der Stickstoffgehalt des Serums, der ebenfalls bestimmt wurde, nimmt zunächst ab, dann über 100° wieder zu.

Zu ähnlichen Ergebnissen ist auch Sidler[2]) gelangt.

Obwohl man zweifellos auf Grund der angeführten Werte imstande ist, gegebenenfalls Milchmischungen oder die Art des Erhitzens von pasteurisierter oder sterilisierter Milch zu erkennen, so haben doch die Methoden in der Praxis zur systematischen Kontrolle von pasteurisierter Milch und von Milchmischungen wegen ihrer Umständlichkeit keinen Eingang gefunden.

Aus diesem Grunde hat man versucht, die durch physikalische Methoden gefundenen Werte der Milchseren zum Nachweis der Milcherhitzung nutzbar zu machen. Kroon[3]) spricht aber auch diesen Methoden jeden praktischen Wert ab.

Zur Prüfung der Milcherhitzung auf Grund der Peroxydasenreaktion benutzten Wilkinson und Peters[4]) ein Essigsäureserum und fanden, daß darin mit Benzidin und Hydroperoxyd noch 15% rohe Milch, 5% aber nicht mehr nachweisbar sind. Rothenfußer[5]) bemerkt, daß die von ihm schon früher in Vorschlag gebrachte Benzidinreaktion, womit er noch 1% rohe Milch erkennen kann, ihren eigentlichen Wert und ihre höhere Leistungsfähigkeit erst in der Verwendung bei dem von ihm empfohlenen Bleiserum erhalte. Aus den Arbeiten von Storch[6]), Siegfeld[7]), Schaffer[8]), Herholz[9]), Kastle und Porch[10]), Wäntig[11]), Hesse und Kooper[12]) geht hervor, daß die Peroxydasenreaktion mit p-Phenylendiamin empfindlich gegen Säuren ist, weshalb die Essigsäureseren vor der Ausführung dieser Reaktion neutralisiert werden müssen. Die Überlegenheit der Benzidinreaktion und der Guajakol-p-Phenylendiaminreaktion von Rothenfußer kann daher voraussichtlich nur auf eine günstigere Wasserstoffionenkonzentration zurückgeführt werden.

An Stelle des Essigsäureserums zum Nachweis erhitzter Milch hat Kirchner[13]) das Spontanserum vorgeschlagen, und Koning[14]) zeigt in neuster Zeit, daß man durch die Temperatur, bei welcher die Gerinnung des Eiweißes beginnt, die Art des Erhitzens feststellen kann.

Da das Spontanserum meistens opalisiert und, wie Koning beobachtete, einen Verlust an gerinnbarem Eiweiß erleidet (vergl. S. 251), ließ sich schon aus diesen Gründen annehmen, daß das Spontanserum zum Nachweis der Milcherhitzung nicht gut geeignet ist.

---

[1]) Landw. Jahrb. d. Schweiz **19**, 233 (1905).
[2]) Schweiz. Wochenschr. f. Chem. und Pharm. **41**, 205 u. 217 (1903).
[3]) Landbouwkundig Tijdschrift **12**, 51 (1904); Ref. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. **9**, 160 (1905).
[4]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. **16**, 172 (1908).
[5]) Milchw. Zentralbl. **6**, 468 (1910).
[6]) Milchztg. **31**, 81 (1902).
[7]) Zeitschr. f. angew. Chem. 1903, S. 764.
[8]) Schweiz. Wochenschr. f. Chem. u. Pharm. **38**, 169 (1900).
[9]) Milchw. Zentralbl. **4**, 445 (1908).
[10]) Journ. of Biol. Chem. **4**, 301 (1908); Ref. Chem. Zentralbl. 1908, I, 2107.
[11]) Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte **26**, 464 (1907).
[12]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. **21**, 385 (1911).
[13]) Nach Siegfeld, Zeitschr. f. angew. Chem. 1903, S. 764.
[14]) Milchw. Zentralbl. **6**, 141 u. 179 (1910).

Von Rubner[1]) wurde ein durch Ausfällen des Kaseins und Fettes mit Kochsalz hergestelltes Serum zum Nachweis der Milcherhitzung empfohlen. Middelton[2]) verwendet dieses Serum auch zum Nachweis von Mischungen roher und gekochter Milch und zwar auf Grund der Bestimmung des gerinnbaren Eiweißes. An Stelle von Kochsalz benützt De Jager[3]) Magnesiumsulfat zum Aussalzen von Kasein und Fett. Auch diese Seren sind nicht so klar, daß sie sich zum Nachweis von 2—3 % roher Milch in erhitzter Milch eignen würden.

Die Tetraseren sind nun zur Prüfung auf Milcherhitzung besser geeignet als alle bisherigen Seren, weil sie klarer als diese sind, rascher hergestellt werden können und nicht bloß zu diesem Zwecke dienen. Ferner ergibt sich bei der Anwendung beider Seren nebeneinander für die Beurteilung der Milcherhitzung ein neuer Gesichtspunkt insofern, als die Lichtbrechungsdifferenz der beiden Seren als Maßstab für die Menge des gerinnbaren Eiweißes der Milch dienen kann. Ein besonderer Vorteil des Tetraserums I ist in dem Umstande gegeben, daß es sich gleichzeitig zur Ausführung der Peroxydasen- und Albuminprobe eignet, wodurch die Sicherheit des Nachweises der Milcherhitzung verschärft wird. Wie oben (S. 281) gezeigt wurde, sind mit diesem Serum auf Grund dieser zwei Proben noch 2—3 % roher Milch in erhitzter Milch erkennbar, weshalb es insbesondere für die sichere Entscheidung der Frage, ob bei Seuchengefahr die Milch ausreichend erhitzt und nicht nachträglich durch rohe Milch infiziert wurde, zu empfehlen ist.

Für den Nachweis von erhitzter Milch in Milchmischungen, die sowohl die Peroxydasenreaktion als die Albuminprobe geben, wird die umständliche Bestimmung des gerinnbaren Eiweißes entbehrlich gemacht, weil sich aus der Differenz der beiden Seren ein Anhaltspunkt für dessen Menge ergibt. Zur näheren Unterscheidung, ob bei kleiner Differenz hoch pasteurisierte oder eine Mischung von roher Milch mit gekochter oder sterilisierter Milch vorliegt, dient das Verhalten des Tetraserums I beim Erwärmen auf 65°. Scheidet sich bei dieser Temperatur noch Eiweiß, d. h. ein in der Kälte nicht wieder löslicher Niederschlag ab, so erklärt sich eine abnorm kleine Differenz der Refraktion beider Seren nur durch die Annahme einer Mischung von roher und über 65° erhitzter Milch; bleibt jedoch das Serum vollständig klar, so hat man es zweifellos mit hochpasteurisierter Milch zu tun.

Anwendung der Tetraseren zur Prüfung auf pathologisch oder physiologisch veränderte Milch.

Ripper[4]) machte beim internationalen milchwirtschaftlichen Kongreß in Brüssel die Aufsehen erregende Mitteilung, daß Milch kranker Tiere mit dem einfachen Verfahren der Bestimmung der Lichtbrechung des Essigsäureserums, dessen Lichtbrechungswert in solchen Fällen bedeutend unter die Durchschnittswerte normaler Seren sinke, erkannt werden könne. Das Verfahren wurde von Ertel[5]), Rievel[6]), Mayrhofer[7]), Wittmann[8]), Schnorf)[9], Koning[10]) nachgeprüft, mit dem Ergebnis, daß auch bei kranker Milch, insbesondere bei Milch

[1]) Hyg. Rundschau **5**, 1021 (1895); Jahresber. d. Tierchem. **25**, 213 (1895).
[2]) Hyg. Rundschau **11**, 601 (1901).
[3]) Zentralbl. f. med. Wissensch. **34**, 146 (1896).
[4]) Wien. Landw. Ztg. 1903. — Milchztg. **32**, 610 (1903).
[5]) Milchztg. **33**, 81 (1903). — Österr. Molker.-Ztg. **I**, 1 (1904).
[6]) Deutsche tierärztl. Wochenschr. **13**, 133 (1905).
[7]) Wien. Landw. Ztg. **6**, 20. Jan. 1904.
[8]) Österr. Molk.-Ztg. 15. März 1904. — Österr. Molk.-Ztg. **12**, 75 (1905).
[9]) Neue physik.-chem. Untersuchungen der Milch. 1905.
[10]) Milchw. Zentralbl. **4**, 160 (1908).

eutertuberkulöser Tiere ganz normale Werte der Lichtbrechung der Essigsäureseren gefunden wurden. Diese sich widersprechenden Befunde lassen sich erklären, wenn man bei der Durchsicht der betreffenden Arbeiten auf die Herstellung der Essigsäureseren näher eingeht. Es zeigt sich nämlich, daß selbst Ripper zwei Vorschriften angibt, wonach Essigsäureseren mit verschiedenem Gehalt an gerinnbarem Eiweiß erhalten werden und daß die Nachprüfer auf genaue Einhaltung der Temperatur und Zeit des Erhitzens kein Gewicht legen, so daß Seren von ganz verschiedenem Gehalt an gerinnbarem Eiweiß zur Bestimmung der Lichtbrechung benutzt wurden. Schon bei normaler Milch beträgt der Unterschied zwischen der Lichtbrechung eines Serums, welches alle albumin- und globulinartigen Stoffe noch enthält und derjenigen eines von gerinnbarem Eiweiß freien Serums 2—3 Refraktometergrade und entspricht daher fast dem Unterschied der von Ripper angegebenen Grenzzahlen; ferner kann, wie oben erörtert wurde, bei pathologisch und physiologisch veränderter Milch der Gehalt an gerinnbarem Eiweiß auf das Vielfache ansteigen, der Milchzucker dagegen zum Teil oder fast ganz verschwinden. Es läßt sich daher voraussehen, daß ein Serum, welches z. B. bei 45° hergestellt wurde, ganz normale Werte, dagegen ein Serum einer längere Zeit im Wasserbade erhitzten Milch abnorm niedrige Zahlen liefert, da sich im ersten Fall die durch den niedrigen Milchzuckergehalt erniedrigte Lichtbrechung durch den erhöhten Gehalt an gerinnbarem Eiweiß ausgleichen kann. Ferner ist zu erwarten, daß auch die Werte eines von gerinnbarem Eiweiß freien Serums gelegentlich normale Werte der Lichtbrechung zeigen können, wenn nämlich die Lichtbrechung einerseits durch einen sehr niedrigen Gehalt an Milchzucker, anderseits durch einen erhöhten Gehalt an Mineralbestandteilen, wie er bei pathologisch veränderter Milch oft vorkommt, zu normalen Durchschnittswerten sich ausgleicht. Die Richtigkeit dieser Auffassung wird durch ein Beispiel (S. 273) bestätigt.

In Berücksichtigung dieser Umstände erscheint es zweckmäßig, zur Prüfung auf pathologisch und physiologisch veränderte Milch die Lichtbrechung der Tetraseren I und II und deren Differenz, welche dem gerinnbaren Eiweiß entspricht, zu bestimmen. Es ist nach den vorhergegangenen Erörterungen ohne weiteres ersichtlich, daß sich die Abnormität der Milch meistens schon aus der abnorm hohen Differenz und der relativ niedrigen Lichtbrechung des Tetraserums II ergeben wird. Sollte die letztere innerhalb normaler Werte liegen, so kann der Befund zweckmäßig durch die Messung der Drehung der Polarisationsebene des Lichtes durch das Tetraserum II ergänzt werden. Da nämlich die Mineralstoffe wohl auf die Lichtbrechung, nicht aber auf die optische Drehung einwirken, so hat man in der Lichtbrechung der Hauptsache nach einen Maßstab für Zucker und Mineralstoffe, in der optischen Drehung aber nur für Zucker. Die Abnormität ergibt sich daher aus einem Mißverhältnis zwischen Lichtbrechung und Drehung.

Anwendung der Tetraseren zur quantitativen Bestimmung von Albumin.

Das Essigsäureserum, in dem man nach Hoppe-Seyler[1]) die Summe von Albumin und Globulin bestimmt, wird folgendermaßen bereitet: Man verdünnt 20 ccm Milch mit Wasser bis auf 400 ccm, fügt hierzu sehr verdünnte Essigsäure (1 : 100) in einzelnen Tropfen, bis sich eben ein flockiger Niederschlag zeigt, leitet während einer halben Stunde einen Strom von Kohlendioxyd durch die Flüssigkeit und läßt diese dann 12 Stunden ruhig stehen, worauf vom Kasein abfiltriert wird. Es ist zweckmäßig, 3 solcher Proben auf gleiche Weise zu behandeln und von diesen diejenige zur weitern Behandlung zu wählen, in welcher die Flüssigkeit vollkommen klar ist. Nach De Jager[2]) leitet man unmittelbar in die verdünnte Milch Kohlendioxyd ein und versetzt die durch den Gasstrom in kräftiger Bewegung erhaltene Flüssigkeit tropfenweise mit Essigsäure, bis plötzliche Gerinnung eintritt.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 9, 246 (1884/85); Hoppe-Seylers Handb. der physiolog. und patholog. chem. Analyse, 1909, S. 723.

[2]) Jahresberichte d. Tierchem. 25, 178 (1895).

Das Albumin wird nun nach Hoppe-Seyler dadurch (annähernd!) quantitativ ermittelt, daß man das Serum in einer Porzellanschale einige Minuten im Sieden erhält und nach dem Abfiltrieren und Auswaschen des Niederschlages dessen Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Nach Sebelien[1]) wird das Albumin und Globulin durch Zusatz von Gerbsäure und etwas Magnesiumsalz gefällt und im Niederschlag ebenfalls der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt, wobei etwas mehr Stickstoff gefunden wird, als nach Hoppe-Seyler, was unseres Erachtens auf noch gelöstes Albumin und Globulin im Essigsäureserum, welches beim Neutralisieren und Eindampfen herausfällt, zurückzuführen ist. Neben der quantitativen Bestimmung der Summe von Albumin und Globulin nach Hoppe-Seyler und Sebelien wird zurzeit das Schloßmannsche[2]) Verfahren, nach welchem diese Stoffe in einem mit Kalialaun hergestellten Serum mit Gerbsäure gefällt und wie oben weiter behandelt werden, deshalb mit Vorliebe gebraucht, weil hierbei das zeitraubende Einleiten von Kohlendioxyd überflüssig ist und auch nicht so große Flüssigkeitsmengen zu filtrieren sind[3]).

Da nun die Herstellung des Tetraserums I noch einfacher ist als die des Alaunserums, so empfiehlt sich die unmittelbare Verwendung dieses Serums zur quantitativen Bestimmung der Summe von Albumin und Globulin. Auch auf die Differenz der Trockenmassen beider Tetraseren läßt sich eine Bestimmung der Summe von Albumin und Globulin gründen. Wir werden voraussichtlich Gelegenheit finden, später hierauf zurückzukommen.

Anwendung der Tetraseren zur Bestimmung von Milchzucker.

a) Maß- oder gewichtsanalytische Bestimmungen mit alkalischer Kupferlösung.

Zur Bestimmung von Milchzucker mit alkalischer Kupferlösung hat man früher fast ausschließlich ein nach Hoppe-Seyler hergestelltes, von Albumin und Globulin zum größten Teil befreites Essigsäureserum, d. h. das Filtrat der oben beschriebenen Eiweißgerinnung benützt. Nach Mercier[4]) wird ein solches Serum dadurch gewonnen, daß man 25 ccm Milch mit 200 ccm Wasser versetzt, mit einigen Tropfen Essigsäure im Wasserbade erwärmt, bis das Eiweiß geronnen ist, abkühlt, auf 250 ccm auffüllt und filtriert.

Neben dem Essigsäureserum hat sich dann alsbald ein nach Ritthausen[5]) hergestelltes Kupferserum eingebürgert, dessen Herstellung im Verlaufe der Zeit verbessert wurde. Gegenwärtig scheint die Ausführungsform nach Scheibe[6]) Anklang gefunden zu haben, wonach mit den Eiweißstoffen auch das Calcium (das den Reduktionswert einer Milchzuckerlösung herunter-setzen soll) ausgefällt wird.

Wenn sich die Angaben von Scheibe bestätigen, so dürfte das Tetraserum II, sofern es vor dem endgültigen Zentrifugieren zur Calciumausfällung noch mit Fluornatrium versetzt wurde, zur Milchzuckerbestimmung ebenso gut geeignet sein, weil die geringen Mengen der in diesem Serum noch gelösten Proteinstoffe nach der für die Milchzuckerbestimmung erforderlichen Verdünnung keine meßbare reduzierende Wirkung ausüben.

Ob ein früher vorgeschlagenes Ammoniumalaunserum nach Gill[7]), oder ein nach der französischen amtlichen Methode der Milchzuckerbestimmung mit Alkohol-Essigsäure hergestelltes

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **13**, 143 (1889).
[2]) Milchztg. **26**, 169 (1897).
[3]) Simon, Ztschr. f. physiolog. Chem. **33**, 498 (1907).
[4]) Ref. Milchw. Zentralbl. **1**, 520 (1905).
[5]) Journ. f. prakt. Chem. **15**, 329 (1877).
[6]) Zeitschr. f. analyt. Chem. **40**, 1 (1901).
[7]) Milchztg. **21**, 68 (1892).

oder ein mit Quecksilbersalz gewonnenes Serum[1]), worin der Quecksilberüberschuß wieder entfernt ist, oder ein neuerdings empfohlenes, mit kolloidalem Eisenhydroxyd[2]) oder mit Asaprol[3]) hergestelltes Serum sich besser eignen, als die oben genannten Seren, scheint fraglich zu sein.

b) Refraktometrische Verfahren.

Zur raschen Ermittelung des Milchzuckers in Kuhmilch und aus Kuhmilch bereiteten Milcherzeugnissen hat Wollny[4]) ein den Bedürfnissen der Praxis entsprechendes Schnellverfahren ausgearbeitet, welches auf der Bestimmung der Lichtbrechung des Chlorcalciumserums beruht. Da das Verfahren nur unter der Voraussetzung richtige Werte liefern kann, daß die im Chlorcalciumserum neben Milchzucker noch enthaltenen Stoffe eine gleichbleibende Lichtbrechung zeigen, so können die Ergebnisse von Braun[5]), wonach das Verfahren bei Kuhmilch und bei künstlicher Kindermilch sehr zu empfehlen ist, aber bei Milch anderer Säugetiere, bei Kefir, Kumys und auch bei reinem Milchzucker versagt, nicht überraschen.

Da das Tetraserum II klarer ist als das Chlorcalciumserum und die darin neben Milchzucker enthaltenen Stoffe kleineren Schwankungen unterliegen als im Chlorcalciumserum, so wird es sich lohnen, das Verfahren von Wollny auf das Tetraserum II unter Anwendung des Zeißschen Eintauchrefraktometers zu übertragen.

c) Polarimetrische Verfahren.

Die bisherigen polarimetrischen Verfahren zur Bestimmung des Milchzuckers in der Milch beruhen auf der Voraussetzung, daß in der Milch neben Milchzucker keine andern Kohlenhydrate vorhanden sind, was nach den neusten Untersuchungsergebnissen nach Scheibe[6]) zutreffen soll. Die Verfahren sollen hauptsächlich dazu dienen, um zu praktischen Zwecken, z. B. in synthetischer Kindermilch, den Milchzucker quantitativ zu bestimmen, oder um gewässerte Milch oder pathologisch veränderte Milch auf Grund der Milchzuckermenge nachzuweisen. Für den ersten Zweck dürfte das refraktometrische Verfahren wegen seiner leichtern Ausführbarkeit bei gewöhnlichem Lichte geeigneter sein.

Die Essigsäureseren wurden bisher zu polarimetrischen Messungen nicht vorgeschlagen, weil die bisher hergestellten Essigsäureseren zu wenig durchsichtig waren, um die Drehung des Lichtes scharf zu messen und weil man allgemein bemüht war, hierfür nur Seren herzustellen, aus denen die linksdrehenden Proteinstoffe durch Anwendung von Bleisalzen, Quecksilbersalzen, von komplexen Säuren, Trichloressigsäure, Pikrinsäure, Asaprol usf. vollständig entfernt waren, was bei den von gerinnbarem Eiweiß freien Essigsäureseren nicht völlig zutrifft.

Durch die Anwendung des Tetraserums II, das nach unsern Erfahrungen stets genügend klar war, um die optische Drehung scharf zu messen, ist die erste Schwierigkeit behoben. Die Entfernung sämtlicher Proteinstoffe aber halten wir für den angegebenen Zweck nicht für notwendig, weil nach einigen von uns ausgeführten Versuchen die optische Drehung durch Ausfällung der geringen im Tetraserum II noch enthaltenen Proteinstoffe sich überhaupt nicht ändert. Man kann daher ohne weiteres das Tetraserum II zur polarimetrischen Milchzuckerbestimmung benutzen, wobei die Umrechnung der Drehungsgrade in Milchzuckerprozente überflüssig ist, wenn es sich um den Nachweis von pathologisch oder physiologisch veränderter und gegebenenfalls um gewässerte Milch handelt (vgl. S. 290).

---

[1]) Guérin, Journ. de Pharm. et. Chim. **27**, 236 (1908); Ref. Chem. Zentralbl. 1908, I, 1427.
[2]) Chem. Ztg. **33**, 927 (1909).
[3]) Zeitschr. f. Unt. d. Nahr.- u. Genußm. **5**, 419 (1902).
[4]) [5]) Milchztg. **29**, 786 (1900).
[6]) Zeitschr. f. analyt. Chem. **40**, 1 (1901).

d) Kolorimetrische Verfahren.

Heymann[1]) beschreibt eine neue (?) Methode zur quantitativen Bestimmung des Milchzuckers, die auf dem Verhalten eines Essigsäureserums, d. h. des darin enthaltenen Milchzuckers zu Natronlauge beruht. Die hierbei erhaltenen Färbungen werden mit solchen in Milchzuckerlösungen von bekanntem Gehalt verglichen. Dasselbe wurde bereits früher von Gscheidlen[2]), J. Vogel[3]) und Paschutin[4]) versucht. Zur Herstellung des Serums gibt Heymann folgende Vorschrift: 10 ccm Milch werden mit 3 Tropfen Essigsäure auf 60° erwärmt und vom Kasein abfiltriert. Zur Entfernung des Albumins und Globulins wird zum Sieden erhitzt und nochmals filtriert.

Wir glauben ohne weiteres zu demselben Zweck das Tetraserum II empfehlen zu dürfen.

Anwendung der Tetraseren zur Prüfung auf Zusätze.

a) Rohrzucker, Zuckerkalk, Dextrose, Kochsalz.

Der Nachweis von gewässerter Milch auf Grund der Lichtbrechung oder des spezifischen Gewichts ist für den Fall erschwert oder unmöglich, wenn der Milch gleichzeitig mit Wasser Rohrzucker, Zuckerkalk, Kochsalz, Dextrose, Dextrin usf. zugesetzt wurde. Es ist daher unerläßlich, von Zeit zu Zeit Stichproben auf diese Stoffe zu untersuchen. Die quantitative Bestimmung von Chlor, die zu diesem Zwecke notwendig ist, kommt außerdem für den Nachweis von pathologisch oder physiologisch veränderter Milch in Frage.

Haselstein[5]) hat bereits im Jahre 1883 ein Essigsäureserum zum Nachweis von Dextrin benützt. Nach Salvgado[6]) läßt sich Rohrzucker mit Ammoniummolybdat besser in einem mit Magnesiumsulfat in der Wärme hergestellten Serum als in Milch nachweisen. Nach Baier und Neumann[7]) eignet sich hierzu noch besser ein mit Uranylacetat hergestelltes, von Phosphaten freies Serum. Auf Kalk des Zuckerkalkes wird nach Baier und Neumann in einem mit Salzsäure hergestellten Serum geprüft. Für den Nachweis von Rohrzucker mit der Resorcinreaktion empfiehlt Fiehe[8]) ein mit Salzsäure hergestelltes Serum. Rothenfußer[9]) benützt zu demselben Zweck die Diphenylaminreaktion und ein mit ammoniakalischer Bleilösung hergestelltes Serum, welches sich von andern dadurch vorteilhaft unterscheiden soll, daß es keinen Milchzucker mehr enthält. Nach Vieth[10]) soll jedoch auch Rohrzucker durch die Bleilösung ausgefällt werden. Anderseits gab nach Eichholz[11]) erhitzte Milch ebenfalls die Reaktion nach Rothenfußer, was auch wir bestätigen konnten.

Poetschke[12]) verwendet zur maßanalytischen Bestimmung des Chlors nach dem Volhardschen Verfahren ein mit Kupfersulfat hergestelltes Serum (25 ccm Milch + 150 ccm Wasser + 10 ccm Kupfersulfat [34,639 in 500 ccm Wasser] + 8,8 ccm $^n/_2$ Natronlauge). Koning[13]) bestimmt das Chlor nach der Dichromatmethode in einem Essigsäureserum (50 ccm Milch, einige Tropfen Essigsäure, Erhitzen auf 65°, Auffüllen auf 100 ccm und Filtrieren).

---

[1]) Hyg. Rundsch. **14**, 105 (1904).
[2]) Arch. f. Physiol. **16**, 131 (1878).
[3]) Arb. f. wissensch. Heilk. **1**, 257 (1861).
[4]) Arch. f. Anat. Phys. u. wissensch. Mediz. 1871, S. 316.
[5]) Chem. techn. Rep. 1883, I, 249.
[6]) Revista di chim. pura e applicata **1**, 498 (1905).
[7]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. **16**, 51 (1908).
[8]) Chem. Ztg. **32**, 1045 (1908).
[9]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. **18**, 135 (1909).
[10]) Jahresber. d. Milchw. Instituts zu Hameln, 1909, S. 23.
[11]) Milchw. Zentralbl. **6**, 536 (1910).
[12]) Journ. of. Ind. and. Engin. Chem. **2**, 210 (1910); Ref. Zeitschr. f. angew. Chem. **36**, 1734 (1910).
[13]) Milchw. Zentralbl. **7**, 13 (1911).

Vorversuche haben ergeben, daß alle diese Stoffe mit dem Tetraserum II in genügender Schärfe sich nachweisen und bestimmen lassen. Zur Ausführung der Ammoniummolybdatreaktion ist jedoch das Tetraserum II wegen seines Gehalts an Phosphaten, zur Ausführung der Diphenylaminreaktion wegen seines Gehaltes an Milchzucker weniger gut geeignet.

b) Konservierungsmittel.

Horn[1]) benützt zum Nachweis von Benzoesäure ein Essigsäureserum, welches er konzentriert, mit 40—50 % Alkohol und Ammoniak von den gelösten Eiweißstoffen befreit, um dann die Benzoesäure mit Kupfersulfat zu fällen. Richmond und Miller[2]) verfahren einfacher, indem sie das Essigsäureserum mit Äther, Petroläther oder Chloroform extrahieren und die vom Lösungsmittel aufgenommene Säure mit wenig Alkali und Wasser ausschütteln usf. Auch die Salicylsäure wird von Richmond in derselben Weise isoliert.

Soporetti[3]) erhitzt 10 ccm Milch mit 3—4 Tropfen Essig auf 60—70° und setzt zur Erkennung der Säure direkt Eisenchlorid zu. Ottolenghi[4]) verarbeitet ein Essigsäureserum zur quantitativen Bestimmung von Fluor. Nicolas[5]) empfiehlt ein Essigsäureserum zum Nachweis von Formaldehyd mit Amidol.

In allen diesen Fällen läßt sich ein und dasselbe, von gerinnbarem Eiweiß befreite Essigsäureserum benutzen. Für den Nachweis von Benzoesäure und Salicylsäure erschienen die mit Tetrachlorkohlenstoff erhaltenen Seren zunächst nicht geeignet, weil diese Stoffe im Tetrachlorkohlenstoft löslich sind. Es hat sich jedoch gezeigt, daß die Reaktionen im Tetraserum II nicht wesentlich beeinflußt werden.

Von vornherein ist anzunehmen, daß überall, wo mit Mineralsäuren hergestellte Seren zum Nachweis der Konservierungsmittel benutzt werden, gerade so gut oder noch besser die Tetraseren Verwendung finden können, da nämlich der Zweck der Herstellung der Seren darauf hinausläuft, die Milch von den störenden gerinnbaren Eiweißstoffen und von Fett zu befreien. Hierzu ist aber die Essigsäure, welche wegen ihrer geringeren Dissoziation weniger Eiweiß löst als die Mineralsäuren, besser geeignet. An Stelle der durch Mineralsäuren hergestellten Seren empfehlen sich daher die Tetraseren bei der Prüfung auf Hydroperoxyd mit Titan nach Amberg[6]), oder mit Chromsäure im Ätherextrakt nach Renard[7]), bei der Prüfung von Formaldehyd mit Dimethylanilin nach Jean[8]), von Borsäure nach Koning[9]) oder Jenkins[10]) usf.

Da es zum Nachweis der Benzoesäure und Salicylsäure auf Grund von Ausschüttelungsverfahren nicht notwendig ist, die letzten Reste von Eiweiß aus dem Serum zu entfernen, so halten wir die mittels Alkohol[11]), Quecksilber-[12]) und Kupfer-

---

[1]) Zeitschr. f. analyt. Chem. **30**, 732 (1891).

[2]) Analyst. **32**, 144 (1907); Ref. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. **16**, II, 255 (1908).

[3]) Boll. Chim. Farm. **47**, 751 (1909); Ref. Chem. Zentralbl. 1909, I, 948.

[4]) Atti della R. Accad. dei Fisiocritici **4**, 17 (1905); Ref. Zeitschrift für Unters. der Nahr.- und Genußm. **14**, 364 (1907).

[5]) Compt. rend. **140**, 1123 (1905).

[6]) Journ. of Biol. Chem. **1**, 219 (1906).

[7]) Monit. scientif. **18**, 39, (1904); Ref. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1905, I, 155.

[8]) Rev. chim. ind. **10**, 33 (1899).

[9]) Analyst **24**, 142 (1899).

[10]) Ber. d. landw. Versuchsst. Connecticut 1901, S. 106; Ref. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. **5**, 866 (1902).

[11]) Revis u. Payne, The Analyst **32**, 286, 1907. — Robin, Ann. chim. analyt. appl. **14**, 53 (1909); Ref. Chem. Zentralbl. 1909, I, 1510.

[12]) Girard, Zeitschr. f. analyt. Chem. **22**, 277 (1883).

salzen[1]) hergestellten Seren für entbehrlich. Auch die völlige Abscheidung der Eiweißstoffe durch Alkohol zum Nachweis von Formaldehyd mit Phenylhydrazin im Alkoholserum[2]) ist durch direkte Anwendung des Tetraserums II zu umgehen.

Zur Prüfung auf Hydroperoxyd auf Grund der Peroxydasenreaktion läßt sich das Tetraserum I mit demselben Erfolg verwenden, wie das von Rothenfußer zu diesem Zwecke vorgeschlagene Bleiserum[3]). Auch zum Nachweis von Sulfiten, Phosphiten, Thiosulfat dürfte sich nach bisherigen Versuchen das Tetraserum I unter Verwendung der Jodreaktion eignen.

Über die in Angriff genommenen Versuche zum systematischen raschen Nachweis sämtlicher Konservierungsmittel im Tetraserum II werden wir später berichten.

Sonstige Anwendung der Tetraseren.

Schließlich sei noch erwähnt, daß auch Versuche im Gange sind, um mit Hilfe der Tetraseren oder in Verbindung mit ihrer Herstellung maßanalytisch den Kaseingehalt, die Menge der Alkalien, ferner die von Kohlendioxyd unabhängige Acidität und den Fettgehalt der Milch zu messen.

Ferner sind Versuche vorgesehen zur Lösung der Frage, ob man nicht Asche und Phosphate der Asche (maßanalytisch) besser in den Tetraseren bestimmt als in Milch. Auch wird versucht, das Herstellungsverfahren der Tetraseren für den Nachweis von Farbstoffen und von geronnenem Albumin nutzbar zu machen.

Nach Jolles[4]) soll der in einem Alaun-Serum enthaltene Stickstoff sehr konstant und daher zur Prüfung auf Milchwässerung geeignet sein. Da Alaun nur das Kasein ausfällt, so dürfte hierzu das Tetraserum I ebenso gut verwendbar sein.

Für die direkte Bestimmung der fett- und kaseinfreien Trockenmasse nach Cornalba[5]) ist das Tetraserum I besser geeignet als das bisher benutzte Essigsäureserum, weil es im Gegensatz zu diesem klar und fettfrei ist.

Da durch eine Reihe von Versuchen, welche in der von Schloßmann geleiteten Klinik in Düsseldorf ausgeführt wurden[6]), festgestellt wurde, daß die Essigsäure sich nicht nur zur Herstellung eines das Gesamtalbumin und -globulin enthaltenden Serums von Kuhmilch, sondern auch für Frauen-, Ziegen-, Eselinnen-Milch am besten eignet, so läßt sich ohne weiteres erwarten, daß das Tetraserum I auch für diese Zwecke vorteilhaft verwendet werden kann. Die bisher zur besseren Ausfällung erforderliche Verdünnung der Milch wird voraussichtlich nicht mehr erforderlich sein.

---

[1]) Breustadt, Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. **2**, 866 (1899). — Philippe, Mitt. aus d. Geb. Lebensmittelunters. u. Hyg. **2**, 377 (1911).

[2]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. **5**, 353 (1902).

[3]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. **16**, 589 (1909).

[4]) Verh. d. Vers. Deutscher Naturf. u. Ärzte, 1902, II, 92; Ref. Chem. Zentralbl. 1903, II, 853.

[5]) Rev. gén. du Lait **7**, 33 u. 56 (1908).

[6]) Engel, Arch. f. Kinderheilkunde **53**, Heft 4/6. — Engel, Biochem. Zeitschr. **14**, 234 (1908). — Friedheim, Die Stickstoffverteilung in der Kuh-, Ziegen-, Frauen- und Eselsmilch bei Säure- und Labfällung. Dissertation Bern (1909). — Engel, Bioch. Zeitschr. **13**, 89 (1908). — Gräfingschulte: Über die Bildung von Acidkasein und über die Methodik der Kaseinfällung in Frauenmilch. Dissertation Hannover (1911).

Für albuminreiche Milch (Frauen- und Eselinnenmilch) wurde bei diesen Versuchen im Verhältnis mehr Essigsäure angewandt, was bei der Herstellung des Tetraserums I zu berücksichtigen wäre.

Zusammenfassung.

1. Der vorstehend mitgeteilten Arbeit liegt der Gedanke zugrunde, mit Hilfe von nur zwei einwandfreien Milchseren möglichst viele Untersuchungsverfahren der Milch auszuführen und dadurch die zurzeit erforderliche Herstellung einer größeren Anzahl verschiedener Seren zu vermeiden.

2. Auf Grund eingehender Überlegungen und Versuche haben sich zu diesem Zwecke zwei von uns durch Anwendung von Tetrachlorkohlenstoff verbesserte Essigsäureseren als geeignet erwiesen. Diese beiden Seren werden mit Essigsäure und Tetrachlorkohlenstoff durch Zentrifugieren oder rasch vor sich gehendes Filtrieren gewonnen und unterscheiden sich nur im Gehalt an gerinnbarem Eiweiß. Das bei Zimmertemperatur hergestellte Serum (Tetraserum I) enthält noch alle albumin- und globulinartigen Stoffe; das nach dem Erhitzen der Milch im kochenden Wasserbad gewonnene Serum (Tetraserum II) ist frei von gerinnbarem Eiweiß.

Das Herstellungsverfahren liefert bei frischer und älterer Milch (bis zu 16 Säuregraden) immer Seren von derselben Beschaffenheit, ist so einfach und nimmt so wenig Zeit in Anspruch, daß es auch zur Massenkontrolle geeignet ist.

3. Die physikalischen und chemischen Eigenschaften beider Seren sind an einer größeren Reihe von Milchproben eingehend geprüft und mit denen der bisher am häufigsten angewandten Seren verglichen worden. Hieraus ergibt sich, daß die Tetraseren gegenüber den andern zurzeit gebräuchlichen Seren in keiner Weise Nachteile zeigen und sich vor diesen durch einige Eigenschaften (Klarheit, Fettfreiheit, chemische Zusammensetzung) auszeichnen.

4. Die Anwendbarkeit der Seren für die einzelnen Untersuchungszwecke wurde unter kritischer Beleuchtung der bisher gebräuchlichen Verfahren teils experimentell belegt, teils durch die Eigenschaften der Seren begründet. Darnach erwiesen sich die beiden Tetraseren für die üblichen Untersuchungen, die am Milchserum vorgenommen werden, gut brauchbar und im allgemeinen allen bisher gebräuchlichen Seren überlegen. Von besonderer Wichtigkeit ist die Feststellung, daß durch die Benützung beider Seren nebeneinander wertvolle neue Unterlagen für die Erkennung erhitzter Milch und physiologisch oder pathologisch veränderter Milch sich ergeben.

Vorliegende Arbeit wurde im chemischen Laboratorium des Kaiserlichen Gesundheitsamtes ausgeführt. Herrn Direktor Dr. Kerp, sowie Herrn Regierungsrat Dr. Auerbach sprechen wir für die Anregungen und für das große Interesse, das sie der Arbeit entgegenbrachten, unsern besten Dank aus.

Berlin, Chem. Laboratorium des Kais. Gesundheitsamtes, Februar 1912.

Nachprüfung einiger wichtiger Verfahren zur Untersuchung des Honigs.

Von

Dr. J. Fiehe und **Dr. Ph. Stegmüller**

wissenschaftlichem Hilfsarbeiter früherem wissenschaftlichen Hilfsarbeiter

im Kaiserlichen Gesundheitsamte.

Gelegentlich der Neubearbeitung der „Vereinbarungen" haben wir die wichtigeren Untersuchungsmethoden für Honig einer kritischen Nachprüfung unterzogen. Hierbei sind außer den „Vereinbarungen" selbst, die von der Freien Vereinigung Deutscher Nahrungsmittelchemiker auf den Jahresversammlungen in Frankfurt a. M.[1]) am 10. u. 11. Mai 1907, in Bad Nauheim[2]) am 29. u. 30. Mai 1908 und in Heidelberg[3]) am 21. u. 22. Mai 1909 gemachten Abänderungsvorschläge und gefaßten Beschlüsse in erster Linie berücksichtigt worden. Daneben wurden aber auch die sich aus der umfangreichen Literatur ergebenden Anregungen verfolgt. Die wichtigsten Arbeiten der letzten 13 Jahre auf diesem Gebiete sind, soweit sie den Verfassern bekannt geworden sind, im Anhang zusammengestellt.

Für die experimentellen Untersuchungen kam es sehr zu statten, daß dem Gesundheitsamte durch Vermittlung des Auswärtigen Amtes zahlreiche Auslandshonige zur Verfügung standen. Diese Honigproben (112), die aus fast sämtlichen wichtigeren Honig produzierenden Ländern stammten, waren durch die Kaiserlichen Deutschen Vertretungen im Auslande beschafft worden und stellten somit ein äußerst wertvolles Material dar. Außer diesen Honigen benutzten wir zu unseren Versuchen eine Reihe von deutschen Honigen, darunter auch Tannenhonige aus dem Schwarzwald und den Vogesen.

Die Ergebnisse unserer kritischen Betrachtungen und experimentellen Untersuchungen sind im folgenden zusammengestellt.

I. Bestimmung des Trockenrückstandes.

Der Bestimmung des Trockenrückstandes im Honig kommt eine besondere Bedeutung zu, weil aus dem Trockenrückstand der Nichtzucker berechnet wird (Differenz

[1]) Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel, 1907, **14**, 17.
[2]) „ „ „ „ „ „ „ 1908, **16**, 21.
[3]) „ „ „ „ „ „ „ 1909, **18**, 35.

von Trockenrückstand und Gesamtzucker). Dieser stellt ein wichtiges Kriterium für die Reinheit des Honigs dar. Enthält ein Honig weniger als 1,5% Nichtzucker, so schließen wir auf einen Zusatz von künstlichem Invertzucker, Rohrzucker oder Glykose.

Für die Bestimmung des Trockenrückstandes und damit des Wassers sind bisher hauptsächlich zwei Methoden in Betracht gekommen, die gewichtsanalytische Methode und die Berechnung aus der Dichte der wässerigen Honiglösung.

Ferner ist die Ermittelung des Trockenrückstandes aus dem Brechungsindex des Honigs oder der Lösung zu erwähnen. Über die Anwendung dieses Verfahrens bei der Honiganalyse liegen nur wenige Erfahrungen vor. Nach Untersuchungen von Utz[1]) stimmen die Werte, welche er aus der Dichte der Honiglösung nach der Tabelle von Windisch berechnete und diejenigen, welche er aus dem Brechungsindex nach der Tabelle von L. Tolman und B. Smith[2]) ermittelte, in manchen Fällen nicht genügend überein. Utz empfiehlt daher das Refraktometer auch nur zur Vorprobe und meint, daß vor endgültiger Beanstandung eines Honigs wegen zu hohen Wassergehaltes oder zu geringen Gehalts an Nichtzucker eine gewichtsanalytische Bestimmung erforderlich sei.

Endlich sei noch auf eine von Fabris[3]) ausgearbeitete Methode hingewiesen, wonach das Wasser im Honig direkt durch Destillation mit Terpentinöl bestimmt wird.

Bezüglich der Frage, ob die gewichtsanalytische Bestimmung oder aber die Berechnung des Trockenrückstandes aus der Dichte der Honiglösung richtigere Ergebnisse liefert, herrschen Meinungsverschiedenheiten. Racine[4]) meint, daß die Bestimmung der Dichte der Honiglösung nicht ausreiche, sondern eine direkte Bestimmung des Trockenrückstandes erforderlich sei, während Grünhut[5]) die Ansicht vertrat, daß die gewichtsanalytische Wasserbestimmungsmethode keine genauen Werte ergebe und daher besser fallen gelassen werde.

Hierzu ist folgendes zu bemerken.

Nach den Vorschriften der „Vereinbarungen“[6]) wird die gewichtsanalytische Trockensubstanzbestimmung in der Weise vorgenommen, daß der mit Sand und Wasser gemischte Honig zunächst im Wasserbade eingetrocknet und dann am besten im luftverdünnten Raum bei 100° erhitzt wird. Nach den Vorschlägen der „Freien Vereinigung“ zur Abänderung des Abschnittes „Honig“ der „Vereinbarungen“ soll diese Bestimmungsmethode beibehalten werden.

Es liegt nun eine Reihe von Arbeiten vor, aus denen hervorgeht, daß bei der Bestimmung der Trockensubstanz im Honig und im Invertzucker Temperaturen von

---

[1]) Zeitschr. f. angew. Chemie, 1908, **31**, 1319.
[2]) Journ. Amer. Chem. Soc. 1906, **28**, 1476; Chem. Ztg. Rep. 1907, 13.
[3]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- und Genußmittel, 1911, **22**, 353.
[4]) Zeitschrift für öff. Chemie, 1902, 8, 281.
[5]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- und Genußmittel, 1907, **14**, 17.
[6]) Vereinbarungen zur einheitlichen Untersuchung u. Beurteilung der Nahrungs- und Genußmittel sowie Gebrauchsgegenstände für das Deutsche Reich II, S. 116.

100° und darüber zu vermeiden sind, weil sich bei diesen Temperaturen die Fruktose zersetzt. So erzielten Frank, Th. Shut und Charron[1]) durch Eintrocknen einer Honiglösung auf Sand und Asbest bei Temperaturen von über 70° C kein konstantes Gewicht. Sie schlagen daher ein 24—48stündiges Trocknen bei 65—70° unter Luftverdünnung vor. C. Hoitsema[2]) wendet zum Trocknen des Honigs wegen der leichten Zersetzlichkeit der Fruktose gleichfalls keine höheren Temperaturen an. Er läßt den Honig bis zum konstanten Gewicht einige Wochen im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure stehen. Auch T. Thorne und H. Jeffers[3]) halten eine genaue Bestimmung des Trockenrückstandes im Invertzucker durch direktes Eintrocknen ohne besondere Vorsichtsmaßregeln nicht für möglich. Sie trocknen daher den Invertzucker auf Fließpapier im Kohlensäurestrom bei 65—70° und 50—80 mm Druck.

Nach diesen Angaben erschien es von vornherein unwahrscheinlich, daß durch Trocknen des Honigs bei 100° brauchbare und einwandfreie Ergebnisse erhalten werden.

Wir trockneten mehrere Honige bei 100° mit und ohne Anwendung von Vakuum. Die Honige wurden entsprechend den Vorschriften der „Vereinbarungen" mit Sand und Wasser gemischt und zunächst auf dem Wasserbade und dann im Trockenschrank bei 100° erhitzt. Zum Vergleich wurden die gleichen Honige bei 65—70° im Vakuumapparat unter gleichzeitigem Einleiten von getrockneter Luft[4]) bis zum konstanten Gewicht getrocknet. Wie die nachfolgenden Tabellen I u. II zeigen, erhielten wir nach letzterer Methode meist erheblich mehr Trockensubstanz wie bei 100°. Auch konnte bei Temperaturen von 100° keine genügende Gewichtskonstanz erzielt werden. Wir waren vielmehr stets im Zweifel, ob das Trocknen als beendet anzusehen sei oder nicht. Diese Unsicherheit fiel dagegen bei Anwendung niederer Temperaturen fort.

Tabelle I. Trockenrückstand von Honig:

a) bei 100° im Soxhlettrockenschrank.
b) bei 65—70° im Vakuumapparat unter Luftdurchleiten.

Trockenzeit	Honig Nr. 9		Honig Nr. 10	
	% Trockenrückstand		% Trockenrückstand	
	bei 100° (Soxhlet)	bei 65—70° (Vakuum)	bei 100° (Soxhlet)	bei 65—70° (Vakuum)
1 Stunde	81,21	—	83,02	—
2 Stunden	80,89	—	82,84	—
3 „	80,51	82,71	82,36	83,83
4 „	80,27	—	—	—
6 „	—	82,66	—	83,74

[1]) Chem. News 1903, **87**, 195 und 210.
[2]) Zeitschr. f. anal. Chemie 1899, **38**, 439.
[3]) Journ. Soc. Chem. Ind. 1898, **17**, 114 und Zeitschr. f. Unters. der Nahrungs- und Genußmittel 1898, **1**, 703.
[4]) Die Methode, welche ein Austrocknen innerhalb 5 Stunden ermöglicht, wird umstehend noch näher beschrieben werden.

Tabelle II. Trockenrückstand von Honig:

a) bei 100° im Vakuumtrockenschrank.

b) bei 65—70° im Vakuumapparat unter Luftdurchleiten.

Trockenzeit	% Trockenrückstand			
	bei 100°		bei 65—70° unter Luftdurchleiten	
	Versuch I	Versuch II	Versuch I	Versuch II
3 Stunden	79,54	79,69	80,01	79,88
6 „	79,17	79,22	79,82	79,82
9 „	79,08	79,12	79,85	—
12 „	78,90	79,07	79,80	—

Wie bereits angeführt, trocknen wir den Honig bei 65—70° unter gleichzeitigem Einleiten von getrockneter Luft in den Vakuumapparat. Dadurch wird die Trockenzeit, welche bei dieser Temperatur sonst 24—48 Stunden beträgt, erheblich abgekürzt. Der schwache Luftstrom nimmt die Wasserdämpfe mit fort.

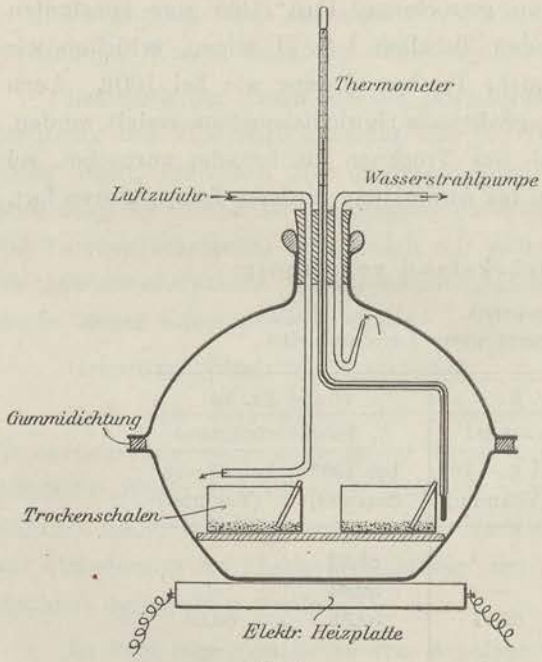


Fig. I.

Der von uns verwendete Trockenapparat (Figur I) besteht aus einem Porzellangefäß von etwa 30 cm Durchmesser und einer dazu passenden Glasglocke, die mit einem dreifach durchbohrten Gummistopfen oben verschlossen ist. Als Dichtung zwischen Schale und Glocke wird ein mit Glyzerin befeuchteter Gummiring verwendet.

Andere Dichtungsmittel z. B. Fett und Harzgemische, erwiesen sich als unzureichend und unzweckmäßig.

Durch den Gummistopfen führen 2 Glasröhren, von welchen die eine für die Zuleitung der getrockneten Luft bestimmt und mit einem System von Schwefelsäureflaschen und Chlorcalciumröhren verbunden ist und die andere zur Wasserstrahlpumpe führt. In der dritten Öffnung befindet sich ein Thermometer, welches passend gebogen ist, um das Hineinstellen der Trockenschalen in den Apparat nicht zu behindern. Als Wärmequelle wird eine elektrische Heizplatte oder auch eine Asbestplatte mit Bunsenbrenner verwendet. Die Temperatur wird im ersteren Falle durch Einschalten von Widerständen geregelt. Glasschalen von etwa 6 cm Durchmesser und 3 cm Höhe mit eingeschliffenem Deckel dienen als Trockenschalen.

Die Bestimmung des Trockenrückstandes im Honig gestaltet sich demnach folgendermaßen:

Zunächst werden die Schalen mit 10 g ausgeglühtem reinem Quarzsand und einem kleinen Glasstäbchen beschickt und gewogen; dann werden von der 20%igen Honiglösung, die unter Umständen auch zur Bestimmung des spezifischen Gewichtes dienen kann, genau 10 ccm hinzugegeben und das Gemisch auf dem Wasserbade unter Umrühren eingedunstet. Dann bringt man die Schalen in den beschriebenen Vakuumapparat, erwärmt so, daß das Thermometer im Innern dauernd 65—70° zeigt und evakuiert auf etwa 30 mm Druck unter gleichzeitigem Einleiten von getrockneter Luft, deren Zufuhr durch Klemmschrauben geregelt wird. Aus den zahlreichen Untersuchungsergebnissen seien folgende als Beispiel angeführt:

Tabelle III. Trockenrückstand von Honig bei 65—70° im luftverdünnten Raum unter Luftdurchleiten bestimmt.

Trockenzeit	Honig Nr. 72 % Trockenrückstand		Honig Nr. 73 % Trockenrückstand		Honig Nr. 75 % Trockenrückstand		Honig Nr. 78 % Trockenrückstand	
	Versuch I	Versuch II	Versuch I	Versuch II	Versuch I	Versuch II	Versuch I	Versuch II
5 Stunden	79,56	79,54	79,19	79,15	81,60	81,72	80,68	80,55
10 „	79,41	79,47	79,13	79,10	81,44	81,67	80,57	80,50
15 „	79,45	79,46	79,13	79,10	81,45	81,61	—	—
20 „	79,41	79,48	79,14	79,10	81,43	—	—	—

Die Analysenwerte lassen erkennen, daß bereits nach 5 Stunden das Trocknen des Honigs beendet ist. Geringe Gewichts-Ab- oder Zunahmen wurden allerdings bei vielstündigem Trocknen beobachtet. Die Unterschiede sind aber so gering, daß ihnen praktische Bedeutung nicht zukommt.

Für die Berechnung des Trockenrückstandes und des Wassers aus der Dichte der Honiglösung sind zwei Tabellen im Gebrauch:

a) Tafel zur Ermittelung des Zuckergehaltes wässeriger Zuckerlösungen aus der Dichte bei 15° C. Nach der amtlichen Tafel der Kaiserlichen Normal-Eichungskommission berechnet von Dr. K. Windisch[1]).

b) Tabelle von Halenke und Möslinger[2]).

Während nach den „Vereinbarungen“ die Verwendung beider Tabellen nebeneinander zulässig ist, soll nach den Vorschlägen der „Freien Vereinigung“ nur die Tabelle von Halenke und Möslinger Verwendung finden. Dieser Vorschlag dürfte darauf zurückzuführen sein, daß die Tabelle von Halenke und Möslinger aus der Untersuchung von Mosten abgeleitet ist, die wie der Honig hauptsächlich Invertzucker enthalten, wohingegen der Tabelle von Windisch die Untersuchung wässeriger Rohrzuckerlösungen zugrunde liegt.

[1]) Berlin. Verlag von Julius Springer 1896.

[2]) Zeitschrift analyt. Chemie 1895, **34**, 270.

Farnsteiner[1]) hat darauf hingewiesen, daß es zweckmäßig sei, für die Bestimmung der Trockensubstanz in Invertzuckerlösungen und Honig die Zuckertabelle von Windisch zu verwenden. Nach der Tabelle von Halenke und Möslinger werde seiner Ansicht nach zu viel Trockensubstanz gefunden. Da bei der Inversion des Rohrzuckers die Dichte der Lösung ebenso erhöht werde wie der Trockenrückstand durch die Umwandlung von Rohrzucker in Glykose und Fruktose, so sei im übrigen die Verwendung einer Rohrzuckertabelle bei Invertzuckerlösungen zulässig. Von Raumer konnte sich dagegen dieser Ansicht nicht anschließen und meinte, daß die amtliche Zuckertabelle nur für Saccharoselösungen Gültigkeit besitze.

Hierzu ist zu bemerken, daß Farnsteiner[2]) bereits früher durch Versuche festgestellt hat, daß gleich konzentrierte Rohrzucker- und Invertzuckerlösungen gleiche spezifische Gewichte besitzen. Auch Beythien und P. Simmich[3]) kommen bei der Nachprüfung der Angaben Farnsteiners zu dem gleichen Ergebnis.

Nach Untersuchungen von Mohr[4]), der die zuverlässigsten Tabellen für die verschiedenen Zuckerarten so umrechnet, daß ein unmittelbarer Vergleich mit der von der Normaleichungskommission bearbeiteten Tabelle für Saccharoselösungen möglich ist, besitzen Saccharoselösungen ein etwas geringeres spezifisches Gewicht als Invertzuckerlösungen gleicher Konzentration. Die Unterschiede sind aber sehr gering

Im Hinblick auf die Ausführungen von Raumers haben wir gleichfalls Versuche ausgeführt, durch welche die Angaben Farnsteiners bestätigt werden konnten.

Es wurden 10 g reiner Rohrzucker in Wasser zu 100 ccm gelöst und aus der Dichte bei 15° C der Zuckergehalt nach der Tabelle von Windisch berechnet[5]). Ferner wurden 10 g Rohrzucker unter Verwendung von 5 ccm Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,188 invertiert und aus der Dichte dieser Lösung (vermindert um die Dichte einer Lösung von 5 ccm Salzsäure in Wasser zu 100 ccm —1) der Zuckergehalt in der gleichen Weise berechnet.

Folgende Werte wurden erhalten:

Tabelle IV. Dichte von Rohrzuckerlösungen vor und nach der Inversion.

Lösung	Dichte der Rohrzuckerlösung bei 15° C $d\,^{15}_{15}$	Gehalt an Rohrzucker nach der Tabelle von Windisch	Dichte derselben Lösung nach der Inversion und Korrektur $d\,^{15}_{15}$	Gehalt an Zucker nach der Tabelle von Windisch
1	1,03883	10,0406	1,04057	10,501
2	1,03882	10,0404	1,04048	10,474
3	1,03882	10,0404	1,04049	10,478

[1]) Zeitschrift f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel 1907, **14**, 17.

[2]) Zeitschrift f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel 1904, **8**, 593.

[3]) Zeitschrift f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel 1910, **20**, 241.

[4]) Wochenschrift f. Brauerei 1905, **22**, 533, u. Zeitschrift f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel 1906, **11**, 522.

[5]) Zum Zwecke des Vergleichs mit der Tabelle von Windisch sind alle Dichtebestimmungen zunächst auf Wasser von 15° bezogen. Weiter unten ist die Umrechnung für die jetzt vorgeschlagene Einheit „Wasser von 4°“ gegeben.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß bei der Inversion von Rohrzucker eine Kontraktion der Lösung und Erhöhung der Dichte stattfindet. Die Erhöhung entspricht der Erhöhung der Trockensubstanz. Während theoretisch aus 10 g Rohrzucker ($C_{12}H_{22}O_{11}$) 10,526 g Invertzucker ($C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6$) erhalten werden sollen, wurde im Mittel 10,48 gefunden; diese geringen Unterschiede sind gegenüber anderen Fehlerquellen, die bei der Berechnung der Trockensubstanz aus der Dichte der Honiglösung in Betracht kommen, belanglos.

Die Verwendung einer Rohrzuckertabelle für die Bestimmung des Trockenrückstandes in Invertzuckerlösungen würde somit zulässig sein. Da es sich aber beim Honig nicht um reine Invertzuckerlösungen, sondern um wechselnde Gemische von Glykose und Fruktose und Nichtzuckerstoffen handelt, so bestand gleichwohl die Möglichkeit, daß nach der Tabelle von Halenke und Möslinger bessere Resultate erzielt würden. Es war daher erforderlich, die durch Trocknen bei 65—70° im luftverdünnten Raume erhaltenen Werte für den Trockenrückstand mit den aus der Dichte der 20%igen Honiglösung nach den zwei Tabellen berechneten Werten zu vergleichen.

Es ergab sich folgendes:

Tabelle V. Trockenrückstand von Honig:

a) gewichtsanalytisch bestimmt,
b) aus der Dichte nach Zucker- und Mosttabellen berechnet.

Nr. des Honigs	Dichte der 20%igen Lösung bei 15° d_{15}^{15}	Trockenrückstand gewichtsanalytisch bei 65—70° %	Trockenrückstand nach der Tabelle von Halenke und Möslinger	Trockenrückstand nach der Tabelle von Windisch
81	1,0634	81,36	83,30	82,20
82	1,0625	80,67	82,10	81,05
83	1,0632	81,50	83,02	81,95
84	1,0631	81,25	82,88	81,80
85	1,0605	77,27	79,45	78,40
86	1,0649	83,49	85,27	84,15
87	1,0647	83,28	85,01	83,90
88	1,0649	83,54	85,27	84,15
89	1,0649	83,66	85,27	84,15
90	1,0662	85,01	86,97	85,85

Aus der Dichte der Honiglösung wurde somit in den angeführten Fällen mehr Trockenrückstand berechnet, als nach dem gewichtsanalytischen Befunde vorhanden war. Die der Tabelle von Windisch entnommenen Werte stimmen aber besser mit den gewichtsanalytischen Befunden überein als die nach der Tabelle von Halenke und Möslinger berechneten. Nach letzterer Tabelle wurde durchweg etwa 2% Trockensubstanz zu viel gefunden.

Schon Windisch[1]) hat in seiner Arbeit über die Bestimmung des Extraktes in Most, Süßweinen usw. die Ansicht ausgesprochen, daß die von Halenke und Mös-

[1]) Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte 1897, **13**, 77.

linger als trocken angesehenen Mostextrakte noch kleine Mengen Wasser enthalten und daher die Extraktwerte ihrer Tabelle etwas zu hoch seien. Dieser Ansicht kann nur zugestimmt werden. Halenke und Möslinger trocknen den mit Sand gemischten Most über konzentrierter Schwefelsäure im luftverdünnten Raum. Da sowohl die Fruktose wie auch die Glykose befähigt sind, Hydrate zu bilden, so ist mit der Möglichkeit zu rechnen, daß die Wasserabspaltung aus diesen Verbindungen bei gewöhnlicher Temperatur nur langsam vor sich geht und nie vollständig wird. Wir konnten bei Honig- und Invertzuckerlösungen unter den von Halenke und Möslinger gewählten Bedingungen keine völlige Entfernung des Wassers erreichen. Selbst nach 48tägigem Trocknen über Schwefelsäure im luftverdünnten Raume enthielten Invertzucker und Honig noch etwa 2 % Wasser. Dieses würde der Trockensubstanzmenge entsprechen, welche nach der Tabelle von Halenke und Möslinger im Honig zu viel gefunden wird. Die Gewichtsabnahme ging außerordentlich langsam vor sich, obschon nur 2 g Substanz zur Anwendung gelangten und das Austrocknen durch Vermischen mit 10 g Quarzsand erleichtert wurde. Wir erhielten folgende Werte:

Tabelle VI. Gewichtsabnahme von Honig und Zuckerlösungen bei gewöhnlicher Temperatur im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure.

Versuch I.			Versuch II.		
Trockenzeit	Honig Nr. 100 % Wasser	Invertzucker % Wasser	Trockenzeit	Honig Nr. 100 % Wasser	Invertzucker % Wasser
8 Tage	10,47	9,94	8 Tage	10,02	9,76
16 „	12,50	11,88	16 „	12,13	11,79
24 „	12,87	12,25	24 „	12,50	12,02
32 „	12,92	12,35	32 „	12,59	12,12
40 „	13,05	—	40 „	12,69	12,24
48 „	13,19	—	48 „	12,78	12,39

Im Vakuumapparat bei 65—70° getrocknet, gab derselbe Honig Nr. 100 15,34 % und der Invertzucker 14,70 % Wasser ab.

Die Untersuchungsergebnisse lassen erkennen, mit welchen Schwierigkeiten das völlige Entwässern von Honig- und Invertzuckerlösungen bei gewöhnlicher Temperatur verbunden ist. Da beim Most ähnliche Verhältnisse vorliegen wie beim Honig, so glauben wir, daß auch im Most Halenke und Möslinger keine völlige Entfernung des Wassers erreicht haben. Ihre Tabelle ist jedenfalls für die Trockensubstanzbestimmung im Honig nicht verwendbar. Mit der Tabelle von Windisch werden dagegen bessere Ergebnisse erzielt. Zu genauen Bestimmungen erscheint uns aber nur die gewichtsanalytische Methode geeignet.

Es liegt in der Natur der Sache, daß aus der Dichte der Honiglösung die Trockensubstanz nicht einwandfrei nach einer Zuckertabelle ermittelt werden kann, weil Honig nicht aus reinem Zucker, sondern aus wechselnden Gemischen von Glykose und Fruktose und Nichtzuckerstoffen besteht, welche die Dichte der Lösung nicht gleichmäßig beeinflussen.

Wie aus Tab. VII hervorgeht, deren Werte durchweg auf Doppelbestimmungen beruhen, konnten wir bei Honigen, deren 20%ige Lösungen die gleiche Dichte besaßen, verschieden große Trockenrückstände gewichtsanalytisch ermitteln.

Tabelle VII. Honige mit verschiedenen Trockenrückständen bei gleicher Dichte der 20%igen Lösung.

Nr. des Honigs	Dichte der 20%igen Lösung	Trockenrückstand gewichtsanalytisch %	Nr. des Honigs	Dichte der 20%igen Lösung	Trockenrückstand gewichtsanalytisch %
28	1,0625	81,53	21	1,0649	83,98
33	„	80,70	42	„	84,11
78	„	80,54	86	„	83,49
82	„	80,67	88	„	83,54
24	1,0626	81,73	89	„	83,66
47	„	80,95	91	„	83,58
68	„	80,47	99	„	83,85
76	„	80,32			
107	„	80,28			
110	„	80,98			

Die Unterschiede der Trockenrückstände bei gleicher Dichte der Lösung erreichen unter Umständen 1,5 %.

Die Berechnung des Trockenrückstandes aus der Dichte der Honiglösung wird daher nur als Vorprobe oder zu annähernden Bestimmungen Verwendung finden können. Unter Umständen wird es hierbei von Vorteil sein, wenn diese Berechnung ohne Benutzung einer Tabelle nach einer bestimmten Formel vorgenommen werden kann. Aus der Menge der angewandten Substanz und der Zunahme der Dichte für 1 g Trockensubstanz auf 100 ccm Flüssigkeit ergibt sich unter Zugrundelegung der Tabelle von Windisch der Prozentgehalt an Trockensubstanz (T) aus der Dichte (d_{15}^{15}) der 20%igen Honiglösung nach folgender Formel:

$$T = \frac{(d_{15}^{15} - 1) \cdot 100}{0{,}003857 \cdot 20} = \frac{d_{15}^{15} - 1}{0{,}0007714}$$

Die Zahl 0,003857 gibt die mittlere Zunahme der Dichte einer Zuckerlösung bei Erhöhung der Trockensubstanz um 1,0 g auf 100 ccm an.

Die Brauchbarkeit der Formel ergibt sich aus der nachfolgenden Zusammenstellung:

Tabelle VIII. Berechnung des Trockenrückstandes von Honig aus der Dichte der Lösung.

Honig Nr.	Dichte der 20%igen Honiglösung (20 g : 100 ccm) bei 15° d_{15}^{15}	Trockenrückstand nach der Tabelle von Windisch %	Trockenrückstand nach der Formel: $T = \frac{d_{15}^{15} - 1}{0{,}0007714}$ %
22	1,0639	82,85	82,84
23	1,0623	80,75	80,76
24	1,0626	81,15	81,15
25	1,0619	80,20	80,25
26	1,0629	81,55	81,54

Aus der auf Wasser von 4° bezogenen Dichte bei 15° d_4^{15} der Honiglösung wird sich der Prozentgehalt des Honigs an Trockensubstanz T nach folgender Formel berechnen:

$$T = \frac{d - 0{,}99915}{0{,}000771}$$

Nach Abschluß unserer Versuche ist eine Arbeit von W. Fresenius und L. Grünhut[1]) erschienen, in welcher in eingehender Weise die indirekte Extraktbestimmung zuckerhaltiger Lösungen mit Hilfe der Tafeln von Windisch und von Halenke und Möslinger kritisch geprüft wird.

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen stellen Fresenius und Grünhut fest, daß die Rohrzuckertafel auch bei der Ermittelung des Extraktgehalts von invertzuckerhaltigen Lösungen ausreichend richtige Ergebnisse liefert. Sie weisen ferner nach, daß die Nichtzuckerstoffe, mit Ausnahme des Eiweißes, bei der Dichtebestimmung invertzuckerhaltiger Lösungen einen erheblichen Fehler in der Richtung bedingen, daß die Rohrzuckertafel gegenüber dem wirklichen Extraktgehalt zu hohe Werte anzeigt. Daher sei zu erwarten, daß bei Extraktbestimmungen im Most mittels der Rohrzuckertafel Werte erhalten werden, die höher sind als der wirkliche Trockengehalt. Da nun die Tafel von Halenke und Möslinger noch höhere Werte liefert, so seien die mit ihrer Hilfe an Mosten gefundenen Extraktgehalte mit großer Wahrscheinlichkeit als zu hoch anzusehen. Es empfehle sich daher, die Benutzung dieser Tabelle in Zukunft aufzugeben und an ihrer Stelle die Rohrzuckertafel von Windisch bei der Mostanalyse allgemein zu gebrauchen.

Setzen wir in diesen Schlußfolgerungen von Fresenius und Grünhut statt „Most" „Honig", so haben wir annähernd das Ergebnis unserer Untersuchungen und Feststellungen.

Neuerdings hat Fabris[2]) den Versuch gemacht, das Wasser im Honig direkt durch Destillation mit Terpentinöl zu bestimmen. Er versetzt 50 g Honig mit 200 ccm Terpentinöl und destilliert von diesem Gemisch aus dem Ölbade 150 ccm ab. Als Vorlage dient ein graduierter Meßzylinder. Das Destillat trennt sich sogleich in 2 Schichten, von denen die obere stets mehr oder weniger emulgiert ist. Aus dieser scheiden sich langsam Wassertröpfchen ab, welche zum Teil an den Wänden des Röhrchens festhaften, so daß sie mit einem Glasstäbchen losgelöst werden müssen. Das abgelesene Volumen soll jedoch etwas zu niedrig sein, weil eine geringe Menge Wasser im Kühler hängen bleibt. Um diesen Fehler auszugleichen, bringt Fabris eine Korrektur von + 0,2 ccm an. Er vergleicht die so erhaltenen Werte mit den aus der direkt ermittelten Trockensubstanz berechneten Wassermengen und findet ziemlich gute Übereinstimmung.

Ein ganz ähnliches Verfahren wurde von Aschmann und J. Arend[3]) beschrieben und für die Bestimmung des Wassers in Butter und Fetten in Vorschlag gebracht. Das Verfahren, welches zuerst von Sjollema bekannt gegeben wurde, besteht in der Destillation des Fettes mit Xylol. Als Vorlage dient eine Trichter-

[1]) Zeitschrift f. analytische Chemie 1912, **51**, 23.
[2]) A. a. O.
[3]) Chemiker-Zeitung 1906, **30**, 953.

röhre mit Geißlerschem Hahn. Die Röhre ist in halbe ccm eingeteilt und der Trichter hat einen Inhalt von etwa 80 ccm. Vor der Destillation wird die Röhre mit Quecksilber gefüllt. Nach der Trennung des Destillates in 2 Schichten wird das Quecksilber soweit abgelassen, daß das Wasser im graduierten Teil der Röhre steht. Das Volumen des Wassers wird bei 15° abgelesen. Als Korrektur für die hängengebliebenen Wassertröpfchen und für den Meniskus wird der abgelesenen Wassermenge 0,1 ccm hinzugerechnet. Wir haben versucht, dieses Xylol-Verfahren bei der Honiguntersuchung anzuwenden. Die wenigen Versuche sind aber nicht gerade ermutigend gewesen. Die Honige bräunten sich und erlitten sichtbar weitgehende Zersetzung; es wurde auch erheblich mehr Wasser gefunden, als nach der gewichtsanalytischen Bestimmung vorhanden war.

Soweit diese Versuche einen Schluß auf das Fabrissche Verfahren mit Terpentinöl zulassen, wird das Verfahren nur unter genauer Einhaltung der vorgeschriebenen Bedingungen brauchbare Ergebnisse liefern. Ein Erhitzen über freier Flamme und ein weiteres Abdestillieren als vorgeschrieben ist, wird unter allen Umständen zu vermeiden sein, um die Zersetzung des Zuckers zu verhüten.

Für genaue Wasserbestimmungen hat Fabris ferner vorgeschlagen, den mit Filtrierpapier aufgesaugten Honig im Luftstrom zu trocknen. Hierbei verfährt er in der Weise, daß er das getränkte Papier in einem U-Rohr unter Durchströmen von trockner Luft zunächst $^1/_2$ Stunde auf 70° erhitzt und dann die Temperatur allmählich auf 95° steigert. Nach $2^1/_2$—3 Stunden soll das Wasser vollständig entfernt sein. Die angeführten Untersuchungsergebnisse stimmen gut überein, und das Verfahren, das mit dem unsrigen grundsätzlich übereinstimmt, erscheint einfach und empfehlenswert.

Es hat sich also folgendes ergeben:

1. Nur die gewichtsanalytische Bestimmung ist geeignet, den wahren Trockengehalt des Honigs zu ermitteln. Bei dieser Bestimmung müssen Temperaturen von 100° und darüber vermieden werden. Als zweckmäßig, einfach und sicher hat sich die Trocknung bei 65—70° im luftverdünnten Raum unter Durchleiten von Luft in der näher angegebenen Weise bei zahlreichen Bestimmungen bewährt.

2. Die indirekte Bestimmung des Trockenrückstandes aus der Dichte der Honiglösung ist unsicher, weil Honige von nachweislich erheblich verschiedenem Trockenrückstand Lösungen von gleicher Dichte liefern. Zur annähernden Ermittelung des Trockenrückstandes kann indessen die Dichte der Honiglösung herangezogen werden unter Benutzung der Rohrzuckertabelle von Windisch oder einer entsprechenden Formel; die Tabelle von Halenke und Möslinger kann dabei keine Verwendung finden.

II. Bestimmung der freien Säure.

Nach den „Vereinbarungen“ und nach den Vorschlägen der „Freien Vereinigung“ soll die freie Säure des Honigs in seiner wässerigen Lösung mit $^1/_{10}$ normaler Alkalilauge unter Benutzung von Phenolphthalein als Indikator bestimmt und als Ameisensäure berechnet werden.

Bei der Nachprüfung dieser Methode ließen die erzielten Ergebnisse die erforderliche Übereinstimmung vermissen. Zur Titration von 10 g Honig, in 50 ccm Wasser gelöst, wurden in einem Falle 1,7 ccm, dann 1,9 und 1,98 ccm $^n/_{10}$ Lauge gebraucht. Bei einem zweiten Honig betrugen die bis zur Rotfärbung verbrauchten Mengen Lauge 2,4; 2,7 und 2,5 ccm. Immer wurde die Beobachtung gemacht, daß die Untersuchungsergebnisse außerordentlich von den Versuchsbedingungen, unter denen gearbeitet wird, abhängig sind.

Dies dürfte in erster Linie auf die Anwesenheit von amphoter reagierenden Substanzen, wie Phosphaten und Albuminaten zurückzuführen sein. Auch die Äpfelsäure, deren Vorkommen im Honig feststeht, gibt bei der Titration unter Benutzung von Phenolphthalein keinen genauen Umschlag. Die esterartigen Verbindungen und die Kohlensäure beeinflussen ferner das Untersuchungsergebnis ungünstig. Bei Verwendung von blauviolettem Lackmuspapier oder Azolitminpapier als Indikator wurden dagegen gut übereinstimmende Werte erzielt. Die Titration ist als beendet anzusehen, wenn ein Tropfen der Lösung keine Rötung des Papiers mehr hervorruft. Die Punkte, bei denen blaues Lackmuspapier nicht mehr gerötet wird und rotes Lackmuspapier gebläut wird, liegen beim Honig erheblich auseinander. So rötete eine Honiglösung (10 g Honig und 50 ccm Wasser) nach Zusatz von 1,3 ccm $^n/_{10}$ KOH blaues Lackmuspapier nicht mehr und erst nach allmählichem Zusatz von weiteren 1,7 ccm $^n/_{10}$ Lauge wurde rotes Lackmuspapier gebläut. Diese Erscheinung ist auf die erwähnten amphoter reagierenden Substanzen des Honigs zurückzuführen.

Bezüglich der Berechnung der Säure ist zu bemerken, daß nach Untersuchungen von Farnsteiner[1]), Heiduschka[2]) und anderen größere Ameisensäuremengen im Honig nicht vorkommen. Die Hauptmenge der Säure besteht nach den Versuchen Heiduschkas aus Äpfelsäure und Milchsäure. Es dürfte daher angebracht sein, entsprechend dem Vorschlage Farnsteiners die Säure des Honigs nicht als Ameisensäure sondern als Äpfelsäure oder Milchsäure anzugeben. Vorteilhafter erscheint es, die Säuremenge in Milligramm-Äquivalenten (= Kubikzentimeter Normal-Lauge) für 100 g Honig auszudrücken.

III. Bestimmung der Asche, der Phosphate und der Alkalität der Asche.

Die „Vereinbarungen“ lassen die Aschenbestimmung mit einer beliebig großen Honigmenge vornehmen. Nach den Vorschlägen der „Freien Vereinigung“ sollen dagegen mindestens 10 g Honig zur Anwendung gelangen. Diesem Vorschlag kann im Hinblick auf den meist sehr geringen Aschengehalt der Honige nur zugestimmt werden.

Bezüglich der Durchführung der Veraschung ist zu bemerken, daß es zur Erzielung genauer Ergebnisse erforderlich ist, die Kohle vor dem völligen Weißbrennen wiederholt mit Wasser auszuziehen. Versäumt man diese Vorsicht, so werden durch die Einwirkung der Kohle auf die kohlensauren Alkalien Verluste entstehen. Die Anwendung des Auslaugeverfahrens ist daher unbedingt erforderlich.

Mit der Bestimmung der Asche kann in einfacher Weise die Bestimmung der Alkalität und der Phosphate verbunden werden. Die Bestimmung der Phosphate im

[1]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genußm. 1908, **15**, 598.
[2]) Pharmaz. Zentralhalle 1911, **40**, 1051.

Honig wird verhältnismäßig selten ausgeführt, was wohl seinen Grund darin haben mag, daß die Bestimmungsmethode nach dem Molybdänverfahren ziemlich umständlich und zeitraubend ist.

Nun läßt sich aber das bekannte acidimetrische Titrationsverfahren der Phosphorsäure sehr gut auf die Untersuchung der Honigasche anwenden, besonders wenn man sich dabei des von Bongartz[1]) empfohlenen Kunstgriffes des Zusatzes von Calciumchlorid bedient.

Das Verfahren gründet sich auf die verschieden starke Säurenatur der 3 H-Ionen der dreibasischen Phosphorsäure. Bei der Titration von Phosphorsäure mit Alkali wird der Neutralitätspunkt von Methylorange erreicht, wenn das erste H-Ion, und sehr annähernd derjenige von Phenolphthalein, wenn das zweite H-Ion abgesättigt ist. Die Differenz zwischen dem Umschlag von Methylorange und Phenolphthalein entspricht also einem Äquivalent (= $^1/_3$ Mol.) der Phosphorsäure. Bei Gegenwart von Calciumsalzen können aber Störungen durch Ausfällung von mehr oder weniger Calciumphosphat eintreten. Um diese auszuschließen, wird nach der Erreichung des Methylorangeumschlages überschüssiges Calciumchlorid zugefügt, wodurch nach der Gleichung:

$$2\,NaH_2PO_4 + 3\,CaCl_2 \rightarrow Ca_3(PO_4)_2 + 4\,HCl + 2\,NaCl$$

oder $$2\,H_2PO_4' + 3\,Ca^{\cdot\cdot} \rightarrow Ca_3(PO_4)_2 + 4\,H^{\cdot}$$

das zweite und dritte H-Ion der Phosphorsäure in titrierbare Form übergeführt werden. Titriert man also nach Zufügung der Calciumchloridlösung bis zur Rötung von Phenolphthalein, so entspricht von der verbrauchten Lauge

$$1\,NaOH = {}^1/_2\,PO_4 \text{ (oder } {}^1/_4\,P_2O_5)$$

also 1 ccm Normallauge = 0,0475 g PO_4 (oder 0,0355 g P_2O_5).

Wir prüften die Brauchbarkeit dieses Verfahrens zunächst an reinen Lösungen von Natriumphosphat nach. Es wurden Lösungen mit bekanntem Phosphatgehalt (1—10 mg P_2O_5 jeweils in 10 ccm) mit etwa 10 ccm $^1/_{10}$ n HCl versetzt und zur Vertreibung etwa vorhandener Kohlensäure ungefähr 10 Minuten gekocht, abgekühlt und mit Alkalilauge gegen Methylorange neutralisiert. Alsdann setzten wir 2 ccm 10%ige Calciumchloridlösung hinzu und titrierten gegen Phenolphthalein bis zur ersten nicht wieder verschwindenden Rotfärbung.

Die Phosphorsäure wurde in der von uns verwendeten Lösung von Natriumphosphat zunächst nach der gewichtsanalytischen Methode von Woy[2]) als $24\,MoO_3 \cdot P_2O_5$ und nach dem gewöhnlichen Verfahren als $Mg_2P_2O_7$ bestimmt. Es ergaben sich folgende Werte:

Tabelle IX. Gewichtsanalytisch ermittelte Mengen Phosphorsäure in reiner Phosphatlösung.

In 10 ccm der Lösung waren P_2O_5		
Probe	als $24\,MoO_3 \cdot P_2O_5$ gewogen	als $Mg_2P_2O_7$ gewogen
1	10,2 mg	9,91 mg
2	9,98 „	9,91 „

[1]) Arch. Pharm. 1885, **22**, 846.

[2]) Treadwell, Quantitative Analyse 1903 II. S. 301.

Für die acidimetrische Bestimmung wurden 10 ccm, 5 ccm und 1 ccm dieser Lösung benutzt. Bei Anwendung von 5 ccm und 1 ccm wurde durch Zusatz der entsprechenden Menge Wasser auf 10 ccm aufgefüllt.

Tabelle X. Acidimetrisch ermittelte Mengen Phosphorsäure in reinen Phosphatlösungen.

Angewandte Menge P_2O_5	Verbrauchte Menge 0,1 n NaOH	Gefundene Menge P_2O_5
10 mg	2,76 ccm	9,80 mg
10 „	2,76 „	9,80 „
10 „	2,79 „	9,90 „
10 „	2,82 „	10,01 „
5 „	1,43 „	5,07 „
5 „	1,42 „	5,07 „
5 „	1,44 „	5,09 „
5 „	1,42 „	5,07 „
	verbrauchte Menge 0,01 n NaOH	
1 „	3,21 ccm	1,11 „
1 „	3,00 „	1,06 „
1 „	3,43 „	1,21 „
1 „	3,21 „	1,11 „

Die acidimetrische Phosphorsäurebestimmung gibt also bei reinen Lösungen hinreichend übereinstimmende Werte mit den gewichtsanalytisch gefundenen Phosphatmengen.

Um bei der Analyse der Honigasche die acidimetrisch ermittelte Phosphorsäure mit Hilfe einer gewichtsanalytischen Methode kontrollieren zu können, wurde versucht, die geringen Phosphorsäuremengen nach der titrimetrischen Bestimmung in der gleichen Lösung mit Ammoniummolybdat $(NH_4)_2\,MoO_4$ zu fällen und entweder nach Woy[1]) oder als $Mg_2P_2O_7$ zu bestimmen. Da bei der Molybdänmethode die Anwesenheit von Chloriden störend ist, wurde das Calciumphosphat $(Ca_3(PO_4)_2)$, welches bei der Titration ausfällt, abfiltriert. Zur Erzielung einer vollständigen und grobkörnigen Ausscheidung gaben wir nach Beendigung der Titration noch einige ccm 0,1 n-Natronlauge hinzu und ließen etwa 12 Stunden stehen. Der Niederschlag wurde auf einem möglichst kleinen Filterchen gesammelt, mit einigen Tropfen Ammoniakwasser ausgewaschen und in möglichst wenig verdünnter Salpetersäure (einige Tropfen genügen) gelöst. Die Fällung mit Ammoniummolybdat wurde nun genau nach der Vorschrift von Woy ausgeführt. Nach mehrstündigem Stehen wurde das Ammoniumphosphormolybdat dekantiert und mit 50 ccm heißer Waschflüssigkeit ausgewaschen. Sollte die Phosphorsäure als Phosphormolybdänsäureanhydrid bestimmt werden, so wurde der ausgewaschene Niederschlag in 5 ccm 8%igem Ammoniak gelöst und zu dieser Lösung 10 ccm Wasser, 20 ccm Ammoniumnitratlösung, 1 ccm Ammoniummolybdat hinzugegeben, dann erhitzt und tropfenweise 10 ccm heiße 25%ige Salpetersäure

[1]) Treadwell, Quantitative Analyse 1903 II. S. 302.

hinzugesetzt. Nach mehrstündigem Stehen sammelten wir den Niederschlag auf einem Goochtiegel und glühten ihn nach der von Woy angegebenen Methode.

Bei der Bestimmung der Phosphorsäure als Magnesiumpyrophosphat wurde der Ammoniumphosphormolybdatniederschlag in möglichst wenig warmem $2^1/_2$%igem Ammoniakwasser gelöst, dann tropfenweise verdünnte Salzsäure hinzugegeben, bis sich der entstehende gelbe Niederschlag langsam wieder löste. Alsdann wurde etwa 1 ccm Magnesiamixtur und $^1/_3$ des Flüssigkeitsvolumens starkes Ammoniak hinzugegeben und 12 Stunden stehen gelassen. Die weitere Ausführung fand in der bekannten Weise statt.

Zunächst wurden die in der Tabelle X angeführten Ergebnisse auf diese Weise (Wägung als 24 $MoO_3 \cdot P_2O_5$) kontrolliert. Es wurden folgende Werte erhalten:

Tabelle XI. Gewichtsanalytisch ermittelte Mengen Phosphorsäure in reinen Phosphatlösungen.

Angewandte Menge P_2O_5 in der Phosphatlösung	Gefundene Menge P_2O_5 berechnet aus 24 $MoO_3 \cdot P_2O_5$	Angewandte Menge P_2O_5 in der Phosphatlösung	Gefundene Menge P_2O_5 berechnet aus 24 $MoO_3 \cdot P_2O_5$
10 mg	10,16 mg	5 mg	5,14 mg
10 „	10,18 „	5 „	4,86 „
10 „	10,02 „	1 „	0,83 „
10 „	10,28 „	1 „	0,70 „
5 „	5,12 „	1 „	0,89 „
5 „	4,70 „	1 „	1,02 „

Durch diese Versuche dürfte bewiesen sein, daß das von uns angewandte Kontrollverfahren einwandfrei ist.

Wir ermittelten nun in der gleichen Weise in mehreren Honigaschen zunächst die Phosphorsäure acidimetrisch und dann gewichtsanalytisch. Um etwa gebildete Pyrophosphate zu hydrolysieren d. h. in Orthophosphate überzuführen, wurde die Honigasche zunächst mit Salzsäure eingedampft und dann in der anfangs beschriebenen Weise weiter behandelt. Folgende Werte wurden erhalten:

Tabelle XII. Acidimetrisch und gewichtsanalytisch ermittelte Mengen Phosphorsäure in der Honigasche.

Honig Nr.	Angewandte Menge	Acidimetrisch P_2O_5	Gewichtsanalytisch P_2O_5
114	20 g	13,7 mg	13,6 mg
111	20 „	3,6 „	2,8 „
106	20 „	1,8 „	1,8 „
106	20 „	1,7 „	1,9 „
105	10 „	1,3 „	1,1 „
103	10 „	1,1 „	0,8 „
100	10 „	1,1 „	0,9 „
100	10 „	1,3 „	1,4 „
98	20 „	1,8 „	1,7 „

Die Brauchbarkeit der acidimetrischen Phosphorsäurebestimmung in der Honigasche geht aus diesen Analysenergebnissen hervor.

Nach Literaturangaben[1]) sollen nun bei der Veraschung pflanzlicher Stoffe die Phosphate durch die glühende Kohle zum Teil zu Phosphor oder Phosphorwasserstoff reduziert werden und so erhebliche Verluste entstehen.

Zur Nachprüfung dieser Angaben versetzten wir 20 g und 10 g Saccharose[2]) mit 10 ccm einer Natriumphosphatlösung, die nach der titrimetrischen Bestimmung 9,58 mg P_2O_5 enthielt. Es wurde nun unter Anwendung des Auslaugeverfahrens verascht und in der Asche die Phosphorsäure wieder titrimetrisch ermittelt.

Tabelle XIII. Acidimetrisch ermittelte Mengen Phosphorsäure in der Asche von Zuckerlösungen.

Angewandte Menge Rohrzucker	P_2O_5 in der zugesetzten Phosphatlösung	Verbrauchte Menge 0,1 n NaOH	Gefundene Menge P_2O_5
20 g	9,58 mg	2,6 ccm	9,23 mg
20 „	9,58 „	2,7 „	9,58 „
10 „	9,58 „	2,6 „	9,23 „
10 „	9,58 „	2,55 „	9,05 „

Ein Verlust von Phosphorsäure konnte somit nicht festgestellt werden. Da mit der Möglichkeit gerechnet werden mußte, daß vielleicht bei einem unlöslichen Phosphat, welches beim Auslaugen der Kohle nicht entzogen wird, doch Verluste infolge der intensiveren Einwirkung der glühenden Kohle eintreten könnten, so wurde auch unter gleichzeitigem Zusatz von Calciumchlorid verascht, wobei folgende Werte an P_2O_5 erhalten wurden:

Tabelle XIV. Acidimetrisch ermittelte Mengen Phosphorsäure in der Asche von Zuckerlösungen.

Angewandte Menge Rohrzucker	P_2O_5 in der zugesetzten Phosphatlösung	Zugesetzte Menge 10%iger Calciumchloridlösung	Verbrauchte Menge 0,1 n NaOH	Gefundene Menge P_2O_5
20 g	9,58 mg	0,5 ccm	2,65 ccm	9,40 mg
20 „	9,58 „	0,5 „	2,75 „	9,76 „
10 „	9,58 „	0,5 „	2,62 „	9,30 „
10 „	9,58 „	0,5 „	2,80 „	9,94 „
10 „	47,7 „	1,0 „	13,48 „	47,85 „
10 „	47,7 „	1,0 „	13,32 „	47,29 „

Auch in diesen Fällen war somit keine Reduktion der Phosphorsäure zu Phosphor oder Phosphorwasserstoff bewirkt worden.

Um festzustellen, ob sich Honige, die doch vermutlich organische Phosphorver-

[1]) Fleurent u. Levi, Compt. rend. 1911, **152**, 715.

[2]) 20 g Saccharose enthielten 0,0020 g Asche. Phosphorsäure war in der Asche nur in Spuren vorhanden, die einer quantitativen Bestimmung nicht mehr zugänglich waren.

bindungen enthalten, anders verhalten, wurden 2 Honigproben in gewöhnlicher Weise verascht und Proben der gleichen Honige unter Zusatz eines Oxydationsmittels (Schwefelsäure und Salpetersäure) zerstört, um etwaige Reduktion der Phosphorsäure zu verhindern.

Es ergaben sich folgende Werte:

Tabelle XV. Acidimetrisch ermittelte Mengen Phosphorsäure in Honigen, die nach zwei verschiedenen Methoden verascht wurden.

Angewandte Menge Honig	Gefundene Menge P_2O_5 bei der gewöhnlichen Veraschung	Gefundene Menge P_2O_5 bei der Zerstörung mit Salpetersäure und Schwefelsäure
20 g	2,6 mg	2,4 mg
20 „	3,1 „	3,0 „

Auch aus diesen Versuchen geht hervor, daß Verluste an Phosphorsäure, bedingt durch Reduktion zu Phosphor oder Phosphorwasserstoff, beim Honig nicht zu befürchten sind.

Mit der acidimetrischen Bestimmung der Phosphorsäure läßt sich die Bestimmung der Alkalität der Asche in einfacher Weise verbinden.

Der Gang der Bestimmung wäre dann folgender:

Die gewogene Asche wird mit 10 oder 20 ccm 0,1 n HCl versetzt, über freier Flamme bis zum beginnenden Sieden erhitzt und die überschüssige Salzsäure mit 0,1 n Natronlauge unter Verwendung von blauviolettem Lackmus- oder Azolitminpapier zurücktitriert. Um möglichst wenig Verluste zu erleiden, wird zum Tüpfeln ein zugespitzter Glasstab verwendet und die auf dem Papier befindliche Lösung wieder in das Gefäß zurückgespült. (Das Azolitminpapier hat sich bei dieser Bestimmung besonders bewährt. Beim Auftupfen entsteht ein kleiner Kreis, innerhalb dessen das Papier von der Flüssigkeit durchtränkt ist. In der Mitte des Kreises tritt die Farbenänderung ein, die sehr leicht erkennbar ist.) Dann gibt man etwa 10 ccm 0,1 n HCl hinzu und spült die Flüssigkeit in ein Erlenmeyerkölbchen. Man erhitzt nun etwa $^1/_2$ Stunde lang in zugedecktem Kölbchen auf dem Wasserbade, läßt erkalten, gibt 1 Tropfen Methylorange hinzu und titriert bis zur zwiebelroten Farbennuance. Dann setzt man 2 ccm 10%iger Calciumchloridlösung und 4—5 Tropfen Phenolphthaleinlösung hinzu und titriert zu Ende.

Besser erscheint es uns noch, als „Alkalität der Asche“ diejenige Menge Alkali zu verstehen, die unter Verwendung von Methylorange als Indikator (nach der Hydrolyse des etwa gebildeten Pyrophosphats durch Erhitzen auf dem Wasserbade mit verdünnter Salzsäure im bedeckten Erlenmeyerkölbchen) ermittelt wird. Die Alkalität der Asche ist ein rein konventioneller Begriff, der außer den Oxyden und Carbonaten noch einen Teil des an die Phosphorsäure gebundenen Alkalis umfaßt. Dieser Teil ist bei Methylorange aber sicherer definiert als beim Lackmus- oder Azolitminpapier.

Schließt man sich dieser Definition an (was um so unbedenklicher ist, als größeres statistisches Material über Alkalität von Honigaschen nicht vorliegt), so gestaltet sich die Bestimmung der Alkalität und der Phosphate der Asche noch erheblich einfacher.

Die gewogene Asche wird mit 10 oder 20 ccm 0,1 n HCl und Wasser in ein Kölbchen aus Jenaer Geräteglas gespült und eine Stunde bei bedecktem Kölbchen auf dem siedenden Wasserbade erwärmt[1]). Nach dem Erkalten gibt man 1 Tropfen Methylorange hinzu und titriert mit 0,1 n Lauge bis zur Übergangsfarbe. Dann setzt man 2 ccm 10%iger neutraler Calciumchloridlösung und 4—5 Tropfen Phenolphthalein hinzu und titriert weiter bis zur ersten bleibenden Rötung.

Auch für andere Nahrungs- und Genußmittel (Wein, Fruchtsäfte usw.) wird die Bestimmung der Phosphorsäure und der Alkalität der Asche in dieser oder ähnlicher Form anwendbar sein und voraussichtlich gute Dienste leisten.

IV. Bestimmung des direkt reduzierenden Zuckers.

Eine Änderung der in den „Vereinbarungen" aufgeführten Bestimmungsmethode des direkt reduzierenden Zuckers im Honig ist bisher nicht vorgeschlagen worden. In den „Vereinbarungen" ist vorgesehen, daß der direkt reduzierende Zucker mit Fehlingscher Lösung gewichtsanalytisch unter Benutzung der Invertzuckertabelle bestimmt wird. (Vergl. Vereinbarungen Heft 1 S. 9.)

Hierzu ist zu bemerken, daß die Werte, welche bei der Zuckerbestimmung mittels Fehlingscher Lösung erhalten werden, außerordentlich von den Versuchsbedingungen, unter denen gearbeitet wird, abhängig sind. Die Festsetzung einer genauen Vorschrift für die Invertzuckerbestimmung im Honig erscheint daher durchaus wünschenswert. Diese Vorschrift könnte den Ausführungsbestimmungen zum Zuckersteuergesetz vom 27. Mai 1896[2]) entnommen werden und würde nach entsprechender Abänderung etwa folgenden Wortlaut erhalten: „50 ccm einer etwa 0,4%igen Honiglösung werden mit 50 ccm Fehlingscher Lösung in einem etwa 300 ccm fassenden Erlenmeyerschen Kolben zum Sieden erhitzt. Das Anwärmen der Flüssigkeit soll möglichst rasch unter Benutzung eines Dreibrenners, eines Drahtnetzes und einer darübergelegten Astbestpappe mit kreisförmigem Ausschnitt geschehen und $3^1/_2$—4 Minuten in Anspruch nehmen; sobald die Flüssigkeit kräftig siedet, wird der Dreibrenner mit einem Einbrenner vertauscht und die Flüssigkeit genau 2 Minuten im Sieden erhalten. Nach Ablauf der Kochdauer wird die Flüssigkeit in dem Kolben sofort mit der gleichen Raummenge luftfreien kalten Wassers verdünnt und durch ein gewogenes Astbestfilterröhrchen filtriert. Das ausgewaschene Kupferoxydul ist als Kupferoxyd oder Kupfer zur Wägung zu bringen und mit den für Invertzucker geltenden Reduktionsfaktoren auf Zucker umzurechnen".

---

[1]) Da sich bei unseren weiteren Versuchen die Honigasche stets als carbonathaltig erwiesen hat und somit die Möglichkeit der Pyrophosphatbildung nicht besteht, so kann das Erwärmen auf dem Wasserbade auf etwa 5 Minuten abgekürzt werden.

[2]) Zentralbl. f. d. Deutsche Reich 1903, 284.

Bezüglich der in dieser Vorschrift vorgesehenen Wägungsform des Kupfers als CuO hat schon Farnsteiner[1]) festgestellt, daß es nicht erforderlich ist, das ausgeschiedene Kupferoxydul zu metallischem Kupfer zu reduzieren. Das Kupferoxydul kann vielmehr nach der Oxydation zu Kupferoxyd als solches zur Wägung gebracht werden. Auch Bolm[2]) fand, daß die aus dem Kupferoxyd berechnete Menge Kupfer mit dem durch Reduktion des Oxydes erhaltenen metallischen Kupfer genügend übereinstimmt. Bolm rechnet daher das gefundene Kupferoxyd mit dem Faktor 0,799 (Cu = 63,6 O = 16,0) auf Cu um und ermittelt dann in der üblichen Weise den Invertzucker.

Wir stellten über diesen Punkt gleichfalls einige Versuche an, welche hauptsächlich den Zweck verfolgten, die Bedingungen, unter denen die Bestimmung des Kupferoxyds vorgenommen werden muß, festzustellen. Es ergab sich, daß es erforderlich ist, die Oxydierung des Kupferoxyduls zu Oxyd unter Durchleiten eines kräftigen Luftstromes vorzunehmen, und zwar so, daß die Masse in lebhaftes Glühen gerät. Versäumt man diese Vorsicht, so werden stark voneinander abweichende Werte erhalten.

In der nachfolgenden Tabelle sind die durch Wägung ermittelten Kupfer- und Kupferoxydmengen mit den aus dem Kupferoxyd durch Umrechnung mit dem Faktor 0,7989 (Cu = 63,57 O = 16,0) erhaltenen Kupfermengen verglichen. Die Werte stimmen gut miteinander überein; die Wägeform des Kupfers als CuO bei der Honiganalyse dürfte daher einwandfrei sein.

Tabelle XVI. Gewogene und aus Kupferoxyd berechnete Kupfermengen bei der Reduktion Fehlingscher Lösung durch Honig.

Nr.	1	2	3
	gewogen		berechnet
	CuO g	Cu g	Cu = 0,7989 · CuO g
1	0,4110	0,3280	0,3283
2	0,4082	0,3257	0,3261
3	0,4135	0,3302	0,3303
4	0,4283	0,3419	0,3422
5	0,4251	0,3400	0,3396
6	0,4182	0,3338	0,3340
7	0,4158	0,3321	0,3321
8	0,4153	0,3312	0,3317
9	0,4313	0,3445	0,3445
10	0,4322	0,3452	0,3452

V. Bestimmung des Rohrzuckers.

Im allgemeinen wird der Rohrzucker für seine Bestimmung zuerst invertiert.

Die Inversion im Honig ist nach den bisherigen Vorschriften der „Vereinbarungen“ mit Hefeinvertin vorgenommen worden. Von der „Freien Vereinigung“

[1]) Forschungsber. über Lebensmittel 1895, 2, 235.

[2]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußmittel 1899, 2, 689.

ist vorgeschlagen worden, die Inversion mit Salzsäure nach der Vorschrift von Herzfeld durchzuführen. Nach dieser Vorschrift werden 10 g Honig mit Wasser zu 75 ccm gelöst, mit 5 ccm Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,188 versetzt und in einem Wasserbade innerhalb 2—3 Minuten auf 67—70° erwärmt. Auf dieser Temperatur wird der Kolbeninhalt noch 5 Minuten unter häufigem Umschütteln gehalten; dann wird abgekühlt und auf 100 ccm aufgefüllt. Dieser Vorschlag dürfte darauf zurückzuführen sein, daß der Vorgang der Inversion des Rohrzuckers mit Hefeinvertin noch nicht genügend geklärt ist. Auch bereitet es Schwierigkeiten, ein Invertin von stets gleicher enzymatischer Wirkung herzustellen, da es noch nicht gelungen ist, Invertin in genügender Weise von den anhaftenden Substanzen zu trennen. So sollen nach Angaben von Wroblewski und Salkowski[1]) die Invertinpräparate des Handels Mannane und Pentosane enthalten. Ferner sind in Invertinpräparaten Dextrin verzuckernde Fermente festgestellt worden. Eine Verwendung derartiger Präparate bei der Honiganalyse ist naturgemäß von vornherein ausgeschlossen.

Für die Beantwortung der Frage, ob die Inversion des Rohrzuckers mit Salzsäure im Honig richtige Ergebnisse liefert, wird das Verhalten der Kohlehydrate des Honigs gegenüber Salzsäure entscheidend sein.

Es scheint festzustehen, daß die Glykose bei der Inversion des Rohrzuckers nach Herzfeld unverändert bleibt. Ebenso dürfte die weit empfindlichere Fruktose bei genauer Einhaltung der Versuchsbedingungen nicht in erheblichem Maße zerstört werden. Die Maltose, deren Vorkommen im Honig von einigen Forschern angenommen wird, bleibt nach Angaben von Grünhut und Rüber[2]) bei der Rohrzuckerinversion durch Salzsäure unangegriffen.

Das Verhalten der Honigdextrine gegen Salzsäure ist dagegen sehr verschieden. Nach Untersuchungen von Hilger und Wolff[3]) kommen im Honig Dextrine von wechselnder Zusammensetzung vor. Die einen stehen dem Zucker und die anderen der Stärke näher. Gegen Säuren verhalten sie sich ungleichmäßig. Die Dextrine, die dem Zucker näher stehen, werden leichter hydrolysiert als die Dextrine mit typischem Dextrincharakter. So erwies sich ein Honigdextrin von der spezifischen Drehung $[\alpha]_D = + 157^0$ gegen schwächere Säuren äußerst widerstandsfähig, während die Dextrine mit $[\alpha]_D = + 131{,}28^0$, $[\alpha]_D = + 125{,}59^0$ und $[\alpha]_D = + 119^0$ durch schwache Säuren leichter hydrolysiert wurden. Es besteht somit die Möglichkeit, daß bei der Rohrzuckerinversion mit Salzsäure in Honig mit einem Gehalt an Honigdextrinen fehlerhafte Resultate erzielt werden. Wenn Lehmann und Stadlinger[4]) feststellen konnten, daß die Honigdextrine bei der Hydrolyse des Rohrzuckers mit Salzsäure nicht wesentlich verändert werden, so dürfte dieses nur für die der Stärke näher stehenden Dextrine zutreffen. Bei Dextrinen, die dem Zucker näher stehen, wird aber mit einer Hydrolysierung gerechnet werden müssen.

Die Inversionsvorschrift nach Herzfeld erscheint somit in ihrer Anwendung bei der Honiganalyse keineswegs einwandfrei. In Ermangelung einer besseren Methode,

[1]) Berichte d. Deutschen Chemischen Gesellschaft 1898, **31**, 304.
[2]) Zeitschrift f. analyt. Chemie 1900, **39**, 22.
[3]) Zeitschrift f. Unters. d. Nahr.- u. Genußmittel 1904, **8**, 110.
[4]) Zeitschrift f. Unters. d. Nahr.- u. Genußmittel 1907, **13**, 397.

die bei gleicher Einfachheit für die Laboratoriumspraxis brauchbar ist, wird sie aber zurzeit nicht entbehrt werden können. Doch wird man zweckmäßig die Lösung neutralisieren und nicht, wie die „Freie Vereinigung“ vorgeschlagen hat, im sauren Zustande zu weiteren Bestimmungen verwenden. Dies würde auch den in den Ausführungsbestimmungen zum Zuckersteuergesetz vom 18. Juni 1903 (Zuckersteuergesetz nebst Ausführungsbestimmungen; herausgegeben vom Reichsschatzamt, Berlin 1903, S. 88) gegebenen Vorschriften entsprechen.

Zwar ist von Pfyl und Linne[1]) eine Inversionsmethode in Vorschlag gebracht worden, nach welcher es möglich ist, Rohrzucker in Gemischen von Zucker mit Dextrin einwandfrei zu bestimmen — nämlich mit Kohlensäure unter Druck. Die Methode ist aber auf ihre Anwendbarkeit beim Honig noch nicht weiter nachgeprüft worden. Auch dürften sich der Einführung dieser Methode, weil sie gegenüber der Herzfeldschen Vorschrift bei weitem umständlicher ist, Schwierigkeiten entgegenstellen.

Für die weitere Durchführung der Rohrzuckerbestimmung nach der Inversion kann außer der bewährten gewichtsanalytischen Methode noch das polarimetrische Bestimmungsverfahren in Frage kommen.

Pfyl und Linne[1]) berechnen den Rohrzucker neben Maltose und Dextrin aus den Polarisationsergebnissen, indem sie die Drehungsdifferenz vor und nach der Inversion durch die spezifische Drehungsdifferenz dividieren. Unter spezifischer Drehungsdifferenz verstehen sie die Differenz der Drehungen von 1 g Rohrzucker in 100 ccm Lösung vor und nach der Inversion im 200 mm Rohr bei 20°. Diese Zahl beträgt 1,7387 Kreisgrade.

Lehmann und Stadlinger[2]) haben den Versuch gemacht, in ähnlicher Weise den Rohrzucker im Honig aus der Drehungsdifferenz der Lösung vor und nach der Inversion zu berechnen. Sie invertieren nach der Vorschrift von Herzfeld und multiplizieren bei Anwendung einer 10%igen Honiglösung die Differenz mit 0,5725. Dabei nehmen sie an, daß in 100 g Honig folgende optisch-aktiven Substanzen enthalten sind:

1. x g eines bei der Inversion unveränderlichen Gemisches aus Nichtzuckerstoffen, Fruktose und Glykose; von dieser Mischung möge 1 g mit Wasser zu 100 ccm Flüssigkeit gelöst im 200 mm Rohr U° drehen;

2. y g Rohrzucker, von dem 1 g mit Wasser zu 100 ccm gelöst im 200 mm Rohr + 1,33° dreht.

Bezeichnet man die Drehung einer Lösung von 10 g Honig zu 100 ccm Wasser im 200 mm Rohr vor der Inversion mit D und nach der Inversion mit D', so lassen sich die Drehungsverhältnisse, die in 10%iger Honiglösung vor und nach der Inversion herrschen, durch folgende Gleichungen ausdrücken:

$$U\,x + 1{,}33\,y = D$$
$$U\,x - 0{,}396 \cdot 1{,}0523\,y = D'$$
$$1{,}33\,y + 0{,}396 \cdot 1{,}0523\,y = D - D' = \Delta$$
$$y = \Delta / (1{,}33 + 0{,}396 \cdot 1{,}0523)$$
$$\text{oder } y = \Delta \cdot 0{,}5725.$$

[1]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1905, **10**, 105.
[2]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1907, **13**, 397.

Dieser Berechnung ist für Rohrzucker die spezifische Drehung $[\alpha]_D = +66{,}5^0$ und für Invertzucker die spezifische Drehung $[\alpha]_D = -19{,}8^0$ zugrunde gelegt. Ferner wird angenommen, daß aus 1,0 g Rohrzucker bei der Hydrolyse 1,0523 g Invertzucker entstehen und demnach 1 g Rohrzucker nach der Inversion $1{,}0523 \cdot 0{,}396^0$ dreht.

Die nach den Berechnungsarten von Pfyl und Linne oder Lehmann und Stadlinger erzielten Ergebnisse sind annähernd gleich. Einer Multiplikation mit 0,5725 würde eine Division durch 1,747 gleich kommen.

Für die Brauchbarkeit ihrer Berechnungsart führen Lehmann und Stadlinger eine Reihe von Beleganalysen an. Aus diesen seien folgende herausgegriffen.

Tabelle XVII. Gewichtsanalytisch und polarimetrisch ermittelte Rohrzuckermengen in Honig nach Lehmann und Stadlinger.

Honig Nr.	Rohrzucker		Die gewichtsanalytische Ermittelung ergab eine Differenz gegenüber der polarimetrischen Berechnung
	gewichtsanalytisch nach Meissl	polarimetrisch nach Lehmann u. Stadlinger	
	%	%	%
1	2,09	2,35	— 0,25
2	4,70	4,98	— 0,28
3	1,69	1,43	+ 0,26
6	2,24	2,86	— 0,62
8	2,00	2,76	— 0,76
9	4,94	4,29	+ 0,65
13	6,38	7,21	— 0,83
14	2,28	2,00	+ 0,28
20	7,04	6,01	+ 1,03

Die gewichtsanalytisch und polarimetrisch ermittelten Rohrzuckermengen stimmen somit in vielen Fällen nicht sonderlich miteinander überein. Ähnliche Erfahrungen wurden von uns gemacht, nur mit dem Unterschied, daß wir fast immer mit der polarimetrischen Methode erheblich mehr Rohrzucker fanden, als gewichtsanalytisch bestimmt wurde. Von unseren Untersuchungsergebnissen seien folgende angeführt.

Tabelle XVIII. Gewichtsanalytisch und polarimetrisch ermittelte Rohrzuckermengen in Honig.

Honig Nr.	Rohrzucker		Die polarimetrische Bestimmung ergab eine Differenz gegenüber der gewichtsanalytischen
	gewichtsanalytisch nach Meissl	polarimetrisch nach Lehmann u. Stadlinger	
	%	%	%
42	4,91	5,43	+ 0,52
43	0,88	1,94	+ 1,06
44	0,68	2,12	+ 1,44
45	10,79	12,30	+ 1,51
46	7,48	8,87	+ 1,39
47	2,39	3,83	+ 1,44
48	1,56	2,18	+ 0,62
49	0,25	1,37	+ 1,12
50	0,70	1,66	+ 0,96

Um festzustellen, ob durch die Salzsäure eine Erhöhung des normalen Drehungsvermögens des Invertzuckers herbeigeführt wird und die beobachteten Unterschiede hierdurch erklärt werden können, wurden folgende Versuche ausgeführt: Es wurden 10 g reiner Rohrzucker[1]) zu 100 ccm Wasser gelöst. Die Lösung drehte im 200 mm Rohr bei 20° C + 13,35°. Ferner wurden 10,0 g Rohrzucker in 75 ccm Wasser gelöst, mit 5 ccm Salzsäure nach der Vorschrift von Herzfeld invertiert und auf 100 ccm aufgefüllt. Die Drehung dieser Lösung im 200 mm Rohr bei 20° C betrug — 4,50°. Nach Lehmann und Stadlinger berechnet sich der Rohrzuckergehalt aus der Drehungsdifferenz mit: 17,85 · 0,5725 = 10,2 g/100 ccm. Nach Pfyl und Linne berechnen sich 10,26 g Rohrzucker in 100 ccm.

Weitere unabhängig hiervon angestellte Versuche mit reinen Rohrzuckerlösungen ergaben folgende Werte.

Tabelle XIX. Polarimetrisch ermittelte Rohrzuckermengen in reinen Rohrzuckerlösungen.

Lösung Nr.	Drehung von 10 g Rohrzucker zu 100 ccm gelöst bei 20° C im 200 mm Rohr in Kreisgraden		Rohrzucker nach Lehmann u. Stadlinger g in 100 ccm
	vor der Inversion	nach der Inversion	
1	+ 13,35	— 4,50°	10,20
2	+ 13,35	— 4,50°	10,20
3	+ 13,33	— 4,46°	10,18
4	+ 13,34	— 4,50°	10,20

Die Salzsäure scheint demnach zwar die Drehung der Invertzuckerlösung um ein geringes zu erhöhen (die spezifische Drehung des gebildeten Invertzuckers würde bei Zugrundelegung der Drehung nach der Inversion von — 4,50° und bei Annahme, daß sich aus 10 g Rohrzucker 10,526 g Invertzucker bilden, $[\alpha]_D = -21{,}37°$ gegenüber — 19,8° betragen), aber nicht in dem Maße, daß dadurch bei reinen Zuckerlösungen die Berechnungsmethode praktisch unbrauchbar würde. Da nun beim Honig größere Unterschiede beobachtet wurden, so vermuten wir, daß die Drehung der Nichtzuckerstoffe des Honigs durch die Salzsäure erheblich mehr beeinflußt wird. Durch eine geringe Inversion der Dextrine wird dieser Fehler vielleicht in einigen Fällen verringert oder aufgehoben.

Die polarimetrische Bestimmungsmethode des Rohrzuckers im Honig unter Verwendung von mit Salzsäure invertierten Lösungen erscheint uns jedenfalls für genaue Bestimmungen nicht geeignet. Mit der Methode werden Ergebnisse erzielt, die mit den gewichtsanalytisch ermittelten Werten nicht in Einklang zu bringen sind.

Außer dem Inversionsverfahren können noch Methoden für die Bestimmung des Rohrzuckers in Betracht kommen, die auf ganz anderer Grundlage beruhen.

So ist neuerdings von A. Jolles[2]) eine Methode zur quantitativen Bestimmung des Rohrzuckers neben anderen Zuckerarten ausgearbeitet worden. Das Verfahren

[1]) Von der Firma E. Merck in Darmstadt.

[2]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **20**, 631.

beruht darauf, daß Arabinose, Rhamnose, Glykose, Fruktose, Galaktose, Mannose, Maltose und Laktose beim Erhitzen ihrer etwa 1—2%igen Lösung bei einem Alkalitätsgrad von $^1/_{10}$ normal in der Weise abgebaut werden, daß sie optisch inaktiv werden. Rohrzuckerlösungen bleiben unter den gleichen Bedingungen unverändert. Die Bestimmung des Rohrzuckers gestaltet sich demnach folgendermaßen: Die entsprechend verdünnte, geklärte Lösung wird $^1/_{10}$ normal alkalisch gemacht und entweder $^3/_4$ Stunden am Rückflußkühler gekocht oder im Lintnerschen Druckfläschchen $^3/_4$ Stunden im siedenden Wasserbade erhitzt oder auch 24 Stunden bei einer Temperatur von 37° im geschlossenen Gefäße stehen gelassen. Letztere Methode soll den Vorteil haben, daß nur eine geringe Dunkelfärbung der Lösung eintritt. Nach dem Abkühlen wird das optische Drehungsvermögen der Lösung bestimmt. Aus der Drehung wird dann der Saccharosegehalt in bekannter Weise berechnet. Jolles hat das Verfahren an Süßweinen, Himbeersaft und konzentrierter Milch erprobt und gute Ergebnisse erzielt. Bei Marmeladen wurden aber größere Unterschiede beobachtet.

Auf ihre Anwendbarkeit beim Honig ist die Methode noch nicht geprüft worden. Es werden sich vielleicht hier Schwierigkeiten entgegenstellen, wegen der im Honig vorhandenen Dextrine. Die Drehung nach der Behandlung der Honiglösung mit Alkalien würde unter Umständen nicht nur durch den Rohrzuckergehalt, sondern daneben auch durch den Dextringehalt bedingt sein. Man könnte allerdings den Rohrzucker mit Salzsäure invertieren und dann die Behandlung mit Alkalien vornehmen. Aus der Differenz der nicht invertierten und dann mit Alkalien behandelten und der invertierten und mit Alkali gekochten Honiglösung würde der Rohrzucker berechnet werden können. Sollte es sich aber ergeben, daß die Honigdextrine durch Kochen mit Alkali ebenso wie die meisten Zuckerarten inaktiv würden, was nicht ausgeschlossen erscheint, da Vollant[1]) festgestellt hat, daß die dem Zucker näher stehenden Dextrine durch Kochen mit alkalischer Wasserstoffsuperoxydlösung abgebaut werden, so würde das Verfahren auch in seiner ursprünglichen Form beim Honig gute Dienste leisten können.

Im Anschluß hieran ist noch eine von P. Lemeland[2]) beschriebene Methode zur direkten Bestimmung des Rohrzuckers zu erwähnen, welche auf ähnlichen Erwägungen beruht wie das Verfahren von Jolles. Lemeland stellte fest, daß die Arabinose, Glykose, Fruktose, Galaktose und Laktose durch Erhitzen auf dem Wasserbade unter bestimmten Bedingungen mit alkalischer Wasserstoffsuperoxydlösung inaktiv werden, während die Saccharose ihre Drehung behält. Vollant[2]) hat das Verfahren an 3 Honigproben des Jahres 1910 nachgeprüft und die dem Honig zugesetzte Saccharose annähernd wiedergefunden.

VI. Prüfung auf künstlichen Invertzucker.

Die Verfahren, welche zum Nachweis von künstlichem Invertzucker im Honig in Vorschlag gebracht sind, gründen sich entweder darauf, daß die Nichtzuckerstoffe des Honigs durch die Mischung mit Invertzucker in ihrer Menge herabgesetzt werden,

[1]) Annal. d. Falsific. 1911, **4**, 504.

[2]) Journal de Pharmacie et de Chimie 1910 [7], **2**, 298 und Annal. d. Falsific. 1911, **4**, 32.

oder darauf, daß durch den Invertzuckerzusatz fremde, von der Herstellung des Invertzuckers herrührende Bestandteile in den Honig gelangen. Ein Nichtzuckergehalt des Honigs von weniger als 1,5 % ist stets verdächtig und läßt auf eine Vermischung mit einem indifferenten Verdünnungsmittel (Invertzucker) schließen.

Das Verfahren von Ley[1]) zum Nachweis von künstlichem Invertzucker im Honig ist in der Herabsetzung der Nichtzuckerstoffe des Honigs, insbesondere der Stickstoffsubstanz, durch Invertzucker begründet. Ley stellte fest, daß Invertzucker und Mischungen von Invertzucker mit Honig ein ganz anderes Verhalten gegen ammoniakalische Silberlösung beim Erhitzen aufwiesen, als reine Honige. Reine Honige gaben ein Gemisch von dunkler Farbe, welches nicht durchsichtig war, aber fluoreszierte und besonders beim Umschütteln an der Wandung des Reagensglases einen braungrünlichen oder gelbgrünlichen Schein hinterließ, während Kunsthonige oder mit Invertzucker verfälschte Honige bei gleicher Behandlung undurchsichtig, braun bis schwarz wurden und insbesondere des gelbgrünen Scheins entbehrten. Browne[2]) beobachtete bei der Nachprüfung dieses Verfahrens bei reinen Honigen viel häufiger die braune Flüssigkeitsfarbe als den grünlichen Schein. Der letztere war bei vielen Proben sehr unbestimmt, während ein charakteristisches Braun, das in seiner Intensität zwischen hellem Rot und Purpur schwankte, bei allen Honigen eintrat. Auch Witte[3]) konnte bei reinen Honigen sehr häufig rotgelbe Färbungen feststellen. Er bezeichnet die Reaktion als „positiv" im Sinne von Kunsthonig, wenn mehr oder minder vollständige Reduktion eintritt und die Flüssigkeit farblos oder violettrot gefärbt ist, als „negativ", wenn die Flüssigkeit beim Schütteln die bekannte grüngelbe oder rotgelbe Färbung zeigt. Eine braunrote oder rotbraune Färbung ist nach Witte „zweifelhaft". Das Verfahren von Ley hat sich viele Freunde erworben. Schwarz[4]) wendet die Silberprobe, besonders in Verbindung mit der Aschenbestimmung mit gutem Erfolg an und Witte[5]) bezeichnet sie als wertvolles Hilfsmittel zur Beurteilung des Honigs. Auch Browne (a. a. O.), Kreis[6]), Petri[7]), Wellenstein[8]) und Theopold[9]) beurteilen die Reaktion nicht ungünstig. Neuerdings wird aber die Brauchbarkeit des Verfahrens stark in Zweifel gezogen, indem behauptet wird, daß nur ganz grobe Verfälschungen damit erkannt werden können und auch reine Honige wie Kunsthonige reagieren. So legt Reinhardt[10]) der Reaktion nur wenig Wert bei, da sie selbst einen Zusatz von 50 % Invertzucker zum Honig nicht erkennen läßt. Reese, Ritzmann und Isernhagen[11]) finden, daß die Reaktion bei Klee- und Rapshonigen und zum Teil auch bei Honigen gemischter Tracht völlig im Stiche läßt.

[1]) Pharm. Ztg. 1903, **48**, 603.
[2]) Zeitschr. d. V. d. Deutschen Zuckerindustrie 1908, **45**, 751.
[3]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **21**, 305.
[4]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1908, **15**, 403.
[5]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **18**, 625.
[6]) Jahresber. Basel 1908, S. 24.
[7]) Jahresber. Koblenz 1909.
[8]) Jahresber. Trier 1908, S. 34.
[9]) Jahresber. Bromberg 1909, S. 16.
[10]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **20**, 113.
[11]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **19**, 625.

Auch Neuhoff[1]), Braungad[2]) und Voermann[3]) beurteilen die Reaktion ungünstig. Nach Angaben von Lührig und Sartori[4]) versagt die Reaktion bei einem Kunsthoniggehalt von 35 % oder weniger.

Wie Koebner[5]) feststellte, steht der Ausfall der Leyschen Silberprobe in engem Zusammenhang mit dem Eiweißgehalt der Honige. Das Silber wird durch die Eiweißstoffe des Honigs kolloidal in Lösung gehalten und so der dem Naturhonig eigentümliche Schein hervorgerufen. Durch Untersuchungen von C. Amberger[6]) wird diese Ansicht Koebners bestätigt und dahin ergänzt, daß es sich nicht um ein reines Hydrosol des Silbers handelt, sondern um eine sogenannte Adsorptionsverbindung, nämlich das Silberhydrosol in Verbindung mit einem hochmolekularen Schutzkolloid. Das Schutzkolloid wurde als Eiweiß identifiziert. Amberger stellte auch in einwandfreier Weise fest, daß normaler Honig dreimal soviel Eiweißstoffe enthält wie als Schutzkolloid erforderlich ist; es sei daher möglich, Honig mit der 2- oder 3-fachen Menge eines indifferenten Stoffes — Invertzucker — zu verdünnen, wobei die Menge des koagulierbaren Honigalbumins noch genügen würde, das bei der Ausführung der Leyschen Reaktion reduzierte Silber in kolloidaler Lösung zu halten.

Die Leysche Probe würde somit bis zu einem gewissen Grade ein Maßstab für den Gehalt der Honige an Eiweißstoffen sein und das Fehlen der Fluoreszenzerscheinung auf einen Mangel an Eiweißstoffen hinweisen. Wenn alle Naturhonige den gleichen oder annähernd den gleichen Gehalt an Eiweißstoffen aufwiesen, wäre die Reaktion geeignet, Zusätze zum Honig, die diesen Gehalt bis zu einer bestimmten Grenze herabsetzen, nachzuweisen. Dies ist nun aber keineswegs der Fall. Nach dem Werke von König[7]) ist der Gehalt des Honigs an Eiweißstoffen vielmehr sehr verschieden und schwankt zwischen 0,03 und 2,67 %. Browne (a. a. O.) stellte in den verschiedenen Honigsorten gleichfalls wechselnde Eiweißmengen fest. Es enthielten Honige von: Luzerne 0,106 %; Algarroba 0,219 %; Linde 0,275 %; Weißeiche 0,294 %; Tulpe 0,444 %; Hickory 0,475 %; Pappel 0,563 % Eiweißstoffe. Honigtauhonige besitzen ferner nach Browne ganz allgemein einen höheren Gehalt an Stickstoffsubstanz als Blütenhonige. Einerseits werden also Honige mit geringem natürlichem Eiweißgehalt, z. B. die Luzernehonige, nach Ley als verfälscht angesprochen werden (Reese [a. a. O.] beobachtete, daß Klee- und Rapshonige sich wie Kunsthonige verhalten), während anderseits Honige mit hohem Eiweißgehalt mit bedeutenden Mengen Invertzucker versetzt werden können, ohne als Kunsthonige zu reagieren. Ein verhältnismäßig geringer Prozentsatz von stark eiweißhaltigem Honig (z. B. Heidehonig) zum Invertzucker würde ferner genügen, um dieses Gemisch zum Naturhonig zu stempeln.

---

[1]) Bericht d. Untersuchungsamtes Dortmund 1908, S. 11.
[2]) Pharm. Ztg. 1909, **54**, 16.
[3]) Chemisch Weekblad 1910, **7**, 638.
[4]) Jahresber. d. Chemischen Untersuchungsamtes Breslau 1907/08, S. 43.
[5]) Chem. Ztg. 1908, **32**, 89.
[6]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **20**, 665.
[7]) Chemie der menschl. Nahr.- u. Genußm. 1903, Bd. I, S. 923.

Es ist aber nicht einmal dieser Zusatz erforderlich, denn durch Zugabe geringer Mengen Hühnereiweiß kann der gleiche Erfolg erzielt werden. Wie wir feststellen konnten, reagiert eine mit Hühnereiweiß versetzte Invertzuckerlösung in der gleichen Weise gegen ammoniakalische Silberlösung und ruft die gleichen Fluoreszenzerscheinungen hervor wie Naturhonig. Ein Zusatz geringer Mengen Milchserum zum Kunsthonig soll nach Angaben Hasterliks (Der Bienenhonig und seine Ersatzmittel, S. 67) gleichfalls Naturhonigreaktion erzeugen.

Hiernach ist es nicht angängig, aus der Reduktion der ammoniakalischen Silberlösung und dem Fehlen der Fluoreszenz einen anderen Schluß zu ziehen, als daß der Honig nur geringe Mengen Eiweißstoffe enthält. Daß der Gehalt an fällbaren Eiweißstoffen in ganz bestimmtem Zusammenhang steht zum Ausfall der Leyschen Probe, konnten wir wiederholt feststellen. Es reagierten die Honige, welche mit Gerbsäurelösung oder Phosphorwolframsäure nach der Vorschrift von Lund[1]) nur geringe Fällungen gaben, wie Kunsthonige, während Honige mit starken Eiweißfällungen Naturhonigreaktion zeigten. Die nach Ley verdächtigen Honige waren dabei aus zuverlässiger Quelle und zweifellos rein. Aus unseren Untersuchungsergebnissen seien folgende herausgegriffen.

Tabelle XX. Ausfall der Leyschen Probe bei reinen Honigen.

Nr. der Sammlung	Trockensubstanz	Invertzucker %	Rohrzucker %	Drehung der 10%igen Lösung vor der Inversion	Drehung der 10%igen Lösung nach der Inversion	Prüfung nach Fiehe	Prüfung nach Ley	Eiweißfällung nach Lund ccm	Beurteilung nach Ley
1	80,6	72,64	3,49	— 1,25°	— 1,85°	minimale Rosafärbung	stark grünlich fluoreszierend	1,8	rein
10	83,5	73,12	5,43	— 1,4	— 2,55	farblos	völlige Reduktion	0,6	verfälscht
12	81,65	72,64	1,44	— 1,6	— 1,8	farblos	stark grünlich fluoreszierend	1,2	rein
16	82,86	71,12	5,24	— 1,05	— 2,05	farblos	völlige Reduktion	0,5	verfälscht
17	81,25	74,28	1,93	— 1,75	— 2,15	minimale Rosafärbung	völlige Reduktion	0,5	verfälscht
32	82,63	71,36	5,85	— 0,96	— 2,27	farblos	völlige Reduktion	0,37	verfälscht

Die Honige Nr. 10, 16, 17 und 32 würden somit nach Ley der Verfälschung verdächtig sein. Der Honig Nr. 10 stammt aus Italien und die Honige 16, 17 und 32 sind spanischen Ursprungs. Die Beobachtung, daß Auslandshonige vielfach als Kunsthonige nach Ley reagieren, ist wiederholt gemacht worden. In dem Handelsbericht des Kaiserlichen Konsulats in Ancona[2]) heißt es:

„Große Mengen (Honig) gehen aus dieser Gegend (Unteritalien) nach Deutschland, wo jedoch der italienische Honig wegen seines hohen Zuckergehaltes, seines Mangels

[1]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **17**, 128; Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung u. Hygiene, veröff. v. Schweizer Ges.-Amt 1910, **1**, 38.

[2]) Deutsches Handelsarchiv 1908, S. 1053.

an Aroma und seiner milchweißen bis zitronengelben Farbe zuerst Mißtrauen erweckte, da die Interessenten vermuteten, daß es sich um gefälschten oder doch Kunsthonig, nicht aber um reinen Bienenhonig handle, umsomehr, als die Untersuchungen der deutschen Nahrungsmittelchemiker diesen Verdacht zunächst bestätigten. Da anderseits nach Lage der Verhältnisse in Italien eine Fälschung oder auch nur eine künstliche Ernährung der Bienen absolut ausgeschlossen war, stellten deutsche Chemiker eingehende Nachforschungen im Produktionslande an und gelangten schließlich zu der Überzeugung, daß die bisherige Untersuchungsmethode mit dem Leyschen Prüfungsmittel für Honige der wärmeren Länder (Italien, Kalifornien, Kuba) ungenügend war und deshalb zu Trugschlüssen führen mußte. Erst nach Ablauf des Jahres 1907 ist in Dr. Fiehes Resorzinlösung ein Prüfungsmittel gefunden worden, welches für die richtige Untersuchung des Produktes der wärmeren Länder geeignet erscheint."

Nach dem Ausfall unserer Untersuchungen können wir diese Angaben durchaus bestätigen. Aus Italien und Amerika kommen vielfach Leguminosen- und Cruciferenhonige zum Versand, welche sich durch einen geringen Eiweißgehalt auszeichnen und infolgedessen nach Ley anomal reagieren. Von Ancona in Oberitalien werden hauptsächlich Kleehonige von weißer Farbe und geringem Aroma nach Deutschland ausgeführt.

Die Reaktion von Ley wird demnach nur mit großer Vorsicht zur Beurteilung des Honigs herangezogen werden können.

Vor einigen Jahren ist von einem von uns (Fiehe)[1]) ein Verfahren zum Nachweis von künstlichem Invertzucker im Honig ausgearbeitet worden, welches sich grundsätzlich von den bisherigen Methoden unterscheidet. Nicht die durch die Verdünnung des Honigs mit indifferenten Zuckern hervorgerufenen Erscheinungen, sondern der Invertzucker selbst soll an den anhaftenden Zuckerzersetzungsprodukten erkannt werden. Wie die späteren Untersuchungen von Keiser[2]) sowie W. Alberda van Ekenstein und J. Blanksma[3]) ergeben haben, handelt es sich um geringe Mengen von β-oxy-δ-methylfurfurol. Der Nachweis dieses Stoffes gestaltet sich in der Weise, daß er zunächst mit Äther der Zuckerlösung entzogen und dann mit Resorzinsalzsäure kenntlich gemacht wird. Der Ätherauszug einer Invertzuckerlösung gibt nach dem Verdunsten mit einigen Tropfen Resorzinsalzsäure (1,0 g Resorzin in 100 g rauchender Salzsäure gelöst) schöne, längere Zeit beständige, kirschrote Färbungen, während Auszüge von Honig keine oder nur minimale Färbungen bei der gleichen Behandlung aufweisen. Während zahlreiche Chemiker die Reaktion als durchaus beweisend für einen Invertzuckerzusatz zum Honig betrachten, wird sie von anderen Chemikern als unzuverlässig bezeichnet. Insbesondere wird gegen die Reaktion vorgebracht, daß auch erhitzte Honige mit Resorzinsalzsäure Rotfärbungen geben. Ein Erhitzen der Honige sei aber im Großhandel nicht zu vermeiden. Es würden daher die Honige, die zum Zwecke der Reinigung und Mischung erhitzt seien, sowie auch die durch Ausschmelzen gewonnenen Honige, und daher in erster Linie Auslandshonige,

[1]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1908, **16**, 75.
[2]) Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt 1909, **30**, 637.
[3]) Chemisch Weekblad 1909, **6**, 217.

ungerechtfertigt beanstandet werden. So konnte Drawe[1]) durch einstündiges Erhitzen eines Honigs auf dem Wasserbade die Reaktion hervorrufen. Von Raumer[2]) beobachtete an Honigen, die nur $^1/_2$ Stunde im Wasserbade erwärmt waren, deutliche Rotfärbungen. Reinsch[3]) erhielt bei erhitzten Honigen in einigen Fällen positive Reaktionen, in anderen Fällen dagegen nicht. Durch weitere Untersuchungen konnte v. Raumer[4]) seine früheren Beobachtungen bestätigen. Insbesondere gaben ausländische Honige aus erster Hand, die er für durchaus einwandfrei hielt, in der Mehrzahl positive Reaktionen. Von Raumer führt dies auf die Gewinnung der Honige durch Erwärmen zurück. Neuerdings bezeichnet v. Raumer[5]) die Reaktion, wenn sie mit 20%iger Salzsäure ausgeführt und mit Vorsicht gedeutet wird, als einen sehr wertvollen Beitrag zur Erkennung von Honigverfälschungen. Klassert[6]), Bremer und Sponnagel[7]) sowie Behre[8]) legen ferner der Reaktion im Hinblick auf das Verhalten erhitzter Honige wenig Wert bei.

Dem gegenüber wird von anderer Seite angegeben, daß ein Erhitzen der Honige, wie es im Großhandel üblich sei oder wie es bei Gewinnung der Auslandshonige in Betracht komme, niemals einen positiven Ausfall der Reaktion zur Folge haben könne. So konnten Riechen und Fiehe[9]) bei erhitzten Honigen keine positiven Reaktionen beobachten. Bei Honigen, welche im Großhandel im Kessel bis zum Schmelzen erhitzt waren, und bei einer Reihe von Auslandshonigen sind von Riechen[10]) ferner keine beständigen Rotfärbungen festgestellt worden. Er hält daher die Reaktion für durchaus zuverlässig und führt als Beweis eine Reihe interessanter Fälle aus seiner Tätigkeit an. Neuhoff[11]) gibt bekannt, daß 13 garantiert reine Honige, darunter 1 Tannenhonig, weder vor noch nach einstündigem Erhitzen auf dem Wasserbade die Reaktion gaben. Utz[12]) konnte gleichfalls keine Beeinträchtigung der Reaktion durch Erhitzen feststellen. M. Nyman und A. Wichmann[13]) erhitzten Honige $^1/_2$, $^3/_4$ und 1 Stunde auf dem Wasserbade und beobachteten keine bemerkenswerte Veränderung im Ausfall der Reaktion; nur eine Probe zeigte nach einstündigem Erwärmen eine Rosafärbung bei Verwendung von 38%iger Salzsäure. Benz[14]) bekam bei Naturhonigen niemals positive Reaktionen, auch nicht nach längerem Erwärmen. Auch Röhrig[15]) hält die Reaktion für durchaus zuverlässig. In Übereinstimmung

---

[1]) Zeitschr. öffentl. Chem. 1908, **14**, 352.
[2]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1908, **16**, 517.
[3]) Bericht d. Chemisch. Untersuchungsamtes der Stadt Altona 1908, S. 25.
[4]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **17**, 115.
[5]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **20**, 583.
[6]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **17**, 126.
[7]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **17**, 664.
[8]) Pharmaz. Zentralhalle 1909, **50**, 175.
[9]) Chem. Ztg. 1908, **32**, 1090.
[10]) Zeitschrift f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **21**, 216.
[11]) Bericht d. Untersuchungsamtes Dortmund 1908, S. 11.
[12]) Zeitschr. angew. Chem. 1908, **21**, 2315.
[13]) Pharmaz. Zentralhalle 1910, **51**, 815.
[14]) Bericht d. Untersuchungsamtes Heilbronn 1908, S. 19.
[15]) Jahresber. d. Chem. Untersuchungsanstalt Leipzig 1909, S. 32.

mit diesen Angaben stehen ferner die Untersuchungsergebnisse zahlreicher anderer Forscher; es sei besonders auf die Arbeiten von Keiser, Baier, Muttelet, Reinhardt und von Voerman und Bakker verwiesen.

Keiser[1]) beobachtete nach einstündigem Erwärmen von Honig auf 100° in keinem Falle kirschrote, sondern hellrote bis lebhaft rote Färbungen. Baier[2]) erhitzte 12 Sorten reiner Linden-, Akazien-, Heide- und Buchweizenhonige je 30 Minuten auf 60° und auf Siedetemperatur, dann direkt über freier Flamme auf 120° und ferner je 5 Minuten lang auf 130, 140, 150, 160, 170 und 180°. In keinem Falle trat eine nennenswerte Rotfärbung mit Resorzinsalzsäure ein, meist überhaupt keine Färbung. Mit Wasser bis zur dunklen Honigfarbe verdünnte Karamellösung gab gleichfalls keine Reaktion. Muttelet[3]) erhitzte zahlreiche Honige mehrere Stunden auf 70—90° im Wasserbade. Die Honige verloren mehr als 40 % ihres Wassergehaltes und gaben keine Kunsthonigreaktion. Honige, die 3 Stunden auf 105—110° erhitzt waren, verloren mehr als 50 % ihres Wassers und veränderten sich dabei völlig. Mit Resorzinsalzsäure gaben sie nur schwache, wenig haltbare Rosafärbungen. Wurden die Honige bis zur Karamelbildung auf hohe Temperaturen erhitzt, so trat die Reaktion ein. Nach Ansicht Muttelets ist das Eintreten der Reaktion stets auf das Vorhandensein von künstlichem Invertzucker und nicht etwa auf Fehler beim Ausschmelzen des Honigs zurückzuführen. Reinhardt[4]) kommt bei der Nachprüfung der Reaktion zu dem gleichen Ergebnis. Er stellte an einem großen Material fest, daß die Reaktion niemals eintritt a) bei Naturhonigen; b) bei reinen Honigen, die auf die in der Praxis übliche Weise erhitzt sind; c) bei reinen ausländischen Honigen, auch wenn sie in zweiter Hand nochmals in der üblichen Weise erhitzt sind; d) bei solchen reinen Honigen, die längere Zeit und bei höheren Temperaturen erhitzt worden sind. Reinhardt bezeichnet die Reaktion als ein ausgezeichnetes Mittel zur Unterscheidung von Natur- und Kunsthonig und zum Nachweis von technischem Invertzucker im Honig. Hinsichtlich der Art und Weise, wie die Erhitzung im Großbetriebe vorgenommen wird, führt er aus, daß ein längeres Erwärmen der Honige als eine halbe Stunde in der Praxis nicht erforderlich sei und daß innerhalb dieser Zeit bei einer Temperatur von 60—70° leicht 80 bis 100 Pfund Honig soweit verflüssigt würden, daß sie geseimt werden können. Nach Mitteilungen aus der Praxis würden Heidehonige im allgemeinen auf 45—50°, amerikanische Honige mit festen Kristallen auf 60—75° und italienische Honige auf 80° erhitzt. Voerman und Bakker[5]) suchten in Honig die Reaktion durch Erwärmen hervorzurufen. Ein sechsstündiges Erwärmen im gut kochenden Wasserbade verursachte nur eine schnell vorübergehende, sehr schwache Rosafärbung bei der Reaktion. Der Honig war aber freilich ungenießbar geworden. Dasselbe Ergebnis wurde mit einem dreistündigen Erwärmen auf 105° erzielt. Voerman und Bakker meinen, daß also ein etwaiges

---

[1]) Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte 1909, **30**, 637.
[2]) Jahresber. d. Untersuchungsamtes d. Landwirtschaftskamm. f. Brandenburg 1908, S. 22.
[3]) Ann. Falsific. 1910, **3**, 503.
[4]) Zeitschrift f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **20**, 113.
[5]) Chemisch Weekblad 1911, Nr. 42; Zeitschrift f. öffentl. Chemie 1911, **17**, 461.

Erhitzen sehr unvorsichtig und hoch geschehen müsse, wenn die Reaktion bei einem echten Honig positiv ausfallen solle. Sie bleibe deshalb, nebst einigen anderen Kennzeichen, eines der wertvollsten Hilfsmittel zur Erkennung von künstlichem Invertzucker.

Wie kommt es nun, daß entgegen all diesen Feststellungen von anderer Seite behauptet wird, die Reaktion könne schon durch mäßiges Erhitzen der Honige auf dem Wasserbade hervorgerufen werden? Ist die von Klassert (a. a. O.) ausgesprochene Ansicht richtig, daß die bei erhitzten Honigen beobachteten positiven Reaktionen durch den hohen Säuregehalt der Honige bedingt werden? Über diesen Punkt können zwei neuere Arbeiten Aufschluß geben, die sich mit der Art der Säuren des Honigs und mit ihrem Einfluß auf Honig beim Erhitzen befassen. Heiduschka[1]) fand im Honig im Durchschnitt 0,007 % Ameisensäure, 0,0225 % Milchsäure und 0,0019 % Äpfelsäure. Oxalsäure war nur in geringen Spuren, Weinsäure und Bernsteinsäure gar nicht nachzuweisen. Lührig und Scholz[2]) untersuchten ferner den Einfluß von Säuren auf Zucker- und Honiglösungen. Durch systematische Versuche stellten sie insbesondere die niedrigste Konzentration fest, von der an organische Säuren, die möglicherweise im Honig vorhanden sein können, eine positive Reaktion hervorrufen.

Sie fanden, daß die Reaktion nach ½stündigem Erhitzen von Honig auf 80° eintritt bei Gegenwart von: 1,6 % Ameisensäure, 1,1 % Milchsäure und 0,8 % Äpfelsäure. Bei Oxalsäure genügten schon 0,2 %, um in einer 7 % Rohrzucker enthaltenden Honiglösung bleibende Rotfärbung hervorzurufen. Merkwürdigerweise konnte mit der gleichen Oxalsäuremenge in einer 3 % Rohrzucker enthaltenden Honiglösung unter den gleichen Bedingungen keine positive Reaktion erzeugt werden. Nach diesen Ergebnissen werden unter Berücksichtigung der Tatsache, daß der Säuregehalt der Honige im allgemeinen zwischen 0,1 und 0,2 % liegt und in den seltensten Fällen 0,20 % überschreitet, die verschiedenen Säuremengen kaum für den verschiedenen Reaktionsausfall erhitzter Honige verantwortlich gemacht werden können. Oxalsäure, welche imstande wäre, die Reaktion hervorzurufen, ist bisher im Honig nicht mit Sicherheit festgestellt worden. Zwar finden sich in der Literatur Angaben, wonach man in alten Honigen Oxalsäure beobachtet hat, doch ist der Nachweis dieser Säure unsers Wissens nicht in einwandfreier Weise erbracht worden. Das Vorkommen größerer Mengen dieser Säure im Honig ist auch durchaus unwahrscheinlich.

Wir haben bei unseren Versuchen ein unterschiedliches Verhalten der Honige nach dem Erhitzen nicht feststellen können und glauben daher, daß Färbungen als positive Reaktion angesprochen wurden, die es in Wirklichkeit nicht waren. Auch ist es nicht unwahrscheinlich, daß bei der Ausführung der Reaktion gewisse Vorsichtsmaßregeln außer acht gelassen sind, deren Beachtung erforderlich ist. Geringe Rosa- oder Orangefärbungen, die zudem wenig haltbar sind, können erhitzte Honige aufweisen. Diese Färbungen sind aber bei eingehender Kenntnis der Reaktion nicht mit den durch künstlichen Invertzucker hervorgerufenen eigenartigen, beständigen

[1]) Pharmaz. Zentralhalle 1911, **40**, 1051.
[2]) Zeitschrift f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **21**, 721.

kirschroten Färbungen zu verwechseln. Eine gewisse Beständigkeit der Reaktion ist ferner vor allem erforderlich, doch braucht die Farbe nicht 24 Stunden haltbar zu sein, wie Reinhardt (a. a. O.) es fordert, vielmehr genügt es, wenn sie innerhalb $^1/_2$ Stunde nicht verblaßt.

Bei der Ausführung der Reaktion ist es weiterhin angebracht, über Natrium aufbewahrten Äther zu verwenden und das Verdunsten des ätherischen Auszuges bei gewöhnlicher Temperatur vorzunehmen. Auch ist es nicht empfehlenswert, größere Mengen Resorzinsalzsäure, als vorgeschrieben sind — nämlich nur einige Tropfen — zu verwenden. Übergießt man den Ätherrückstand mit mehreren Kubikzentimetern Resorzinsalzsäure, so tritt bei Invertzucker allerdings auch die kirschrote Färbung auf, doch geht der Farbenton schneller in braun über.

Sehr schöne, haltbare kirschrote Färbungen kann man bei Invertzuckern, die viel Oxymethylfurfurol enthalten, erzeugen, wenn man den Ätherauszug mit einigen Körnchen Resorzin verdunsten läßt und den trockenen Rückstand dann Salzsäuredämpfen aussetzt. Sobald die schöne Rotfärbung aufgetreten ist, entfernt man durch Schwenken in der Luft die überschüssige Salzsäure und der Rückstand behält nach dem Überziehen mit Damaralack, im dunklen Raum aufbewahrt, wochenlang die schöne Farbe. Setzt man dagegen den Farbstoff noch weiter Salzsäuredämpfen aus, so nimmt die Farbe allmählich einen schwarzbraunen Ton an. Auch durch den Einfluß des Lichtes wird eine allmähliche Veränderung des Farbstoffes hervorgerufen; die rote Farbe wird allmählich braungelb. Es empfiehlt sich daher, die Reaktionsschälchen nicht dem direkten Sonnenlicht auszusetzen. Endlich möchten wir noch erwähnen, daß es erforderlich ist, die Resorzinsalzsäure frisch zu bereiten oder sie wenigstens nicht zu lange und dann nur unter Lichtabschluß aufzubewahren.

Wir beobachteten bei erhitzten Honigen niemals kirschrote Färbungen. Die Honige, welche 4 Stunden lang, und zwar zunächst 1 Stunde auf 70°, dann auf 80°, 85° und 90° erhitzt waren, zeigten folgende Farbenerscheinungen:

Tabelle XXI. Ausfall der Reaktion nach Fiehe bei erhitzten Honigen.

Honig Nr.	Säuregehalt als Ameisensäure berechnet %	Rohrzucker %	Reaktion nach Fiehe
40	0,109	0,34	schwach rot, nach einigen Minuten farblos
48	0,06	1,56	„ „ „ „ „ „
49	0,104	0,25	„ „ „ „ „ „
50	0,077	0,70	„ „ „ „ „ „

Von besonderem Interesse war ferner das Verhalten italienischer Honige, die zum Zwecke der Mischung und Reinigung in Mengen von 80 bis 100 Pfund 3 Stunden lang in fest verschlossenen Kübeln im Wasserbade auf 80—83° erhitzt waren. Keine Probe gab mit Resorzinsalzsäure stärkere oder irgend wie beständige Färbungen.

Tabelle XXII. Ausfall der Reaktion nach Fiehe bei erhitzten Honigen.

Probe	Reaktion nach Fiehe
1	schwach rosa, nach 5 Minuten verblassend
2	„ „ „ 5 „ „
3	orange, rasch farblos
4	schwach rot, dann in 2 Minuten farblos
5	schwach rosa, in 5 Minuten farblos

Zu wiederholten Malen und bei Honigen verschiedener Jahrgänge wurden zahlreiche, in der beschriebenen Weise erhitzte Honige des Handels mit dem gleichen Erfolg untersucht. Für uns besteht daher kein Zweifel, daß auch ein längeres Erhitzen der Honige auf hohe Temperaturen, wenn es sich in den gebräuchlichen und als notwendig erkannten Grenzen hält, keinen positiven Ausfall der Reaktion zur Folge haben kann.

Es ist nun aber mit der Möglichkeit zu rechnen, daß durch eine Karamelisierung des Honigs die Reaktionsträger erzeugt werden. Wenngleich karamelisierte Honige nicht als handelsfähige Ware gelten, sondern als verdorbene Honige anzusehen sind, so ist es für die Deutung der Reaktion doch von Wichtigkeit, wenn die übermäßige Erhitzung in einwandfreier Weise nachgewiesen werden kann. Dieser Nachweis kann mit Hilfe der diastatischen Fermente nach dem Verfahren von Auzinger[1]) geführt werden. Schon längere Zeit vor Veröffentlichung der Abhandlnng von Auzinger hat der eine von uns (Fiehe) fast das gleiche Verfahren wie Auzinger ausgearbeitet und im chemischen Laboratorium des Kaiserlichen Gesundheitsamtes angewendet. Die Veröffentlichung unterblieb, weil Auzinger inzwischen seine Arbeit bekannt gab. Das Verfahren beruht darauf, daß nicht auf hohe Temperaturen erhitzte Honige infolge ihrer diastatischen Eigenschaften lösliche Stärke innerhalb kurzer Zeit verzuckern. Die fortschreitende Verzuckerung kann mit Hilfe von Jodlösung verfolgt werden. Nach unseren Versuchen, worauf wir an anderer Stelle noch näher eingehen, wird die Diastase im Honig erst bei Temperaturen von über 85° zerstört. So besaßen z. B. die erwähnten, 3 Stunden lang auf 80—83° erhitzten Auslandshonige in allen Fällen diastatische Eigenschaften. In Verbindung mit dem Diastasenachweis dürfte die Resorzinsalzsäurereaktion besonders wertvoll sein.

Bei einem positiven Ausfall der Resorzinreaktion ist die Gegenwart von künstlichem Invertzucker nachgewiesen, wenn gleichzeitig die Prüfung auf diastatische Fermente positiv ausfällt; im andern Falle beweist ein positiver Ausfall der Resorzinreaktion, daß entweder künstlicher Invertzucker vorhanden ist, oder aber der Honig angebrannt und verdorben ist. Angebrannte und verdorbene Honige lassen sich aber an den äußeren Eigenschaften erkennen.

[1]) Zeitschrift f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **19**, 65 und 353.

Witte[1]) hat seinerzeit die Ansicht ausgesprochen, daß bei Gegenwart von Diastase jede deutliche Rotfärbung, auch eine nur schwache oder nur am Rande des Schälchens auftretende als Beweis für die Verfälschung des Honigs mit Invertzucker aufzufassen sei. Wir möchten uns dieser Ansicht nicht anschließen. Witte setzt voraus, daß die Diastase schon bei 60—70° zerstört wird. Wie wir feststellen konnten, ist dies nicht zutreffend. Vielmehr geht die Diastase erst bei Temperaturen, die über 85° liegen, zugrunde. Ein mehrere Stunden auf 80° erhitzter Honig enthält Diastase und kann schwache Rotfärbungen aufweisen. Nur ausgesprochene kirschrote Färbungen halten wir daher bei Gegenwart von Diastase als beweisend für eine Verfälschung des Honigs mit Invertzucker oder Kunsthonig.

Wie steht es nun mit den Auslandshonigen, die nach den Ausführungen der Gegner der Reaktion fast regelmäßig positive Reaktionen geben sollen? Dem Gesundheitsamte standen durch Vermittelung des auswärtigen Amtes 112 Honigproben aus Österreich, Ungarn, Italien, Rußland, Spanien, Portugal, Jamaika, Brasilien, Kuba, Mexiko, Ver. Staaten von Amerika, Chile, Argentinien und Australien zur Verfügung. Die Honige waren durch die Kaiserl. Deutschen Vertretungen im Auslande beschafft worden. Da die Besprechung der Untersuchungsergebnisse dieser Honige an anderer Stelle erfolgen soll, so sei hier nur kurz bezüglich des Ausfalles der Invertzuckerreaktion bemerkt, daß drei aus Rußland stammende Honige Reaktionen aufwiesen, die zu Zweifeln Anlaß geben konnten. Außerdem gab noch ein Honig aus Brasilien mit Resorzinsalzsäure stärkere Färbungen. Letzterer Honig war in zugelöteter Blechdose eingesandt worden und an den Lötstellen verbrannt, auch enthielt er keine diastatischen Fermente und besaß Karamelgeschmack. Die russischen Honige schmeckten gleichfalls nach angebranntem Zucker und enthielten keine Diastase. Die Honige waren von schokoladenbrauner Farbe und offenbar angebrannte Buchweizenhonige. Die Färbungen, welche die übrigen Honige mit Resorzinsalzsäure gaben, waren sehr gering. Innerhalb einiger Minuten verblaßten die beobachteten Rosa- bis Orangefärbungen, und nach $^1/_2$ Stunde wurden überhaupt keine Färbungen mehr wahrgenommen. In den meisten Fällen aber blieb der Ätherrückstand nach dem Betupfen mit Resorzinsalzsäure von Anfang an farblos.

Wir konnten somit die Angaben von v. Raumer[2]) und Klassert[3]), daß Auslandshonige durchweg Kunsthonigreaktion zeigen, nicht bestätigen. Es hat sich vielmehr ergeben, daß die aus fast sämtlichen Honig produzierenden Ländern stammenden Honige durchweg wie Naturhonige reagierten. Auch die auf primitive Weise durch Ausschmelzen und Auspressen gewonnenen Erzeugnisse zeigten Naturhonigreaktion. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen stehen die neueren Untersuchungen von K. Lendrich und F. Nottbohm[4]). Nur eine Probe unter 63 Auslandshonigen reagierte mit Resorzinsalzsäure schwach positiv, und dieser Honig enthielt keine Diastase, war von dunkler Farbe

[1]) Zeitschrift f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **21**, 305.
[2]) Zeitschrift f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **17**, 115.
[3]) Zeitschrift f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **17**, 136.
[4]) Zeitschrift f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **22**, 633.

und offenbar übermäßig erhitzt worden. Auch die in der Schweizer Honigstatistik[1]) aufgezählten 230 Honige des Jahres 1910 gaben in keinem Falle positive Reaktionen. Ebenso reagierten die in der Schweizer Honigstatistik[2]) 1909 aufgezählten 284 Honige in allen Fällen negativ.

Für die Beurteilung der Invertzuckerreaktion nach Fiehe sind ferner zwei neuere Abhandlungen von großem Interresse, von denen die eine aus dem Schweizerischen Gesundheitsamt (Die Verwendung der quantitativen Präzipitinreaktion bei Honiguntersuchungen, II. Mitteilung, von Dr. J. Thöni)[3]) und die andere aus dem Bureau of Chemistry des U. S. Department of Agriculture (Chemische Analyse und Zusammensetzung ausländischer Honige von Cuba, Mexiko und Haiti, von A. Hugh Bryan[4]) stammt. Thöni prüfte die Reaktion an 61 echten Honigen der nachfolgenden Länder: Schweiz, Deutschland, Norwegen, Dänemark, Mexiko, Cuba, Chile, Ver. Staaten von Amerika und St. Domingo, sowie an 27 abnormen Honigen. Er kommt zu folgendem Ergebnis: „Aus diesen Resultaten geht hervor, daß echte Bienenhonige die Fiehesche Reaktion nicht gaben, daß dagegen verfälschte Honige, die als solche gekennzeichnet waren, stets positiv reagierten. Es liegt nach meiner Ansicht außer Zweifel, daß wir in der Fiehe-Reaktion ein zuverlässiges Reagens auf gewisse Verfälschungen des Honigs haben."

Bryan prüfte die Reaktion an 72 Honigen aus Cuba, Mexiko und Haiti. Keine der Proben gab eine positive Reaktion auf käuflichen Invertzucker, trotzdem sämtliche Honige so hoch erhitzt waren, daß der kristallisierte Zucker verflüssigt war.

Es erhebt sich nun noch die Frage, ob infolge der Bekanntgabe der Reaktion Kunsthonige in solcher Weise hergestellt werden, daß die Verfälschung dem Nachweis entgeht. Bereits früher wurde von einem von uns (Fiehe) die Befürchtung ausgesprochen, daß infolge der Veröffentlichung des Untersuchungsverfahrens vielleicht eine Änderung in der Kunsthonigfabrikation eintreten könne. Da es sich aber ergab, daß ohne vielseitige Nachprüfung einem neuen Verfahren niemals ausschlaggebende Bedeutung zugesprochen werden kann und insbesondere ein gerichtliches Vorgehen auf Grund des Verfahrens erfolglos ist, so wurde zur Veröffentlichung geschritten. Soweit es sich jetzt beurteilen läßt, sind die gehegten Befürchtungen unbegründet gewesen. Reese[5]) beobachtete bei 81 Kunsthonigen stets eine stark positive Reaktion. Reinsch[6]) konnte trotz vieler Bemühungen keinen Invertzucker auffinden, der die Reaktion nicht gab, und Reinhardt (a. a. O.) hat keinen Kunsthonig in Händen gehabt, der nicht stark positiv reagierte. Ähnliche Ergebnisse werden von anderer Seite berichtet. Uns standen 4 deutsche und 1 russischer Kunsthonig sowie 6 verschiedene Invertzuckerproben des Handels zur Verfügung, die sämtlich stark positiv reagierten. Witte (a. a. O.) berichtet dagegen, daß von 25 Kunsthonigen 22 positiv und 3 negativ

[1]) Schweizer Bienenzeitg. 1911, Nr. 7.
[2]) Schweizer Bienenzeitg. 1910, Nr. 7.
[3]) Mitteilungen aus dem Gebiet der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene. Veröffentl. vom Schweiz. Gesundheitsamt 1912, 3, 74.
[4]) Washington 1912, Bulletin Nr. 154.
[5]) Jahresber. Kiel 1909, S. 12.
[6]) Jahresber. Altona 1909, S. 25.

reagierten. Da aber die letzteren 3 im wesentlichen aus schlecht invertiertem Rübenzucker und Stärkesirup bestanden, so ist der negative Ausfall der Reaktion nicht weiter auffällig. Stärkesirup und schwach invertierte Rohrzuckerlösung sind am Dextringehalt bezw. am Rohrzuckergehalt kenntlich, und in diesen Fällen bedarf es keines anderen Nachweises.

Auch jetzt noch können also Verfälschungen des Honigs mit Invertzucker oder Kunsthonig mit Hilfe der Reaktion erkannt werden. Wenn Reinsch (a. a. O.) feststellen konnte, daß nach Bekanntgabe der Reaktion bedeutend weniger Honige des Handels positiv nach Fiehe reagieren, so ist dies unseres Erachtens darauf zurückzuführen, daß eine tatsächliche Besserung im Verkehr mit Honig eingetreten ist.

Von Lührig[1]) ist gegen die Reaktion noch vorgebracht worden, daß sie nicht beweisend für eine Verfälschung des Honigs mit Invertzucker sein könne, da der Träger der Reaktion beim Verfüttern der Bienen mit Invertzucker in das Fütterungserzeugnis übergehe und nach der gegenwärtigen Rechtslage ein derartiges Erzeugnis als „Honig" anzusprechen sei.

Hierzu ist zu bemerken, daß nach der am 30. März 1908 gefällten Entscheidung des Reichsgerichts (Entscheidungen des Reichsgerichts in Strafsachen Bd. 41, S. 205) allerdings ein Zuckerfütterungshonig dem gewöhnlichen Honig, der durch Einsammeln aus den in den Blüten enthaltenen Pflanzensäften seitens der Biene entsteht, gleichzustellen ist. Es ist aber wohl zu berücksichtigen, daß die Unterlagen, auf denen sich dieses Urteil aufbaute, inzwischen eine nicht unwesentliche Veränderung erfahren haben. Während das Reichsgericht annimmt, daß zwischen einem Zuckerfütterungshonig und einem normalen Blütenhonig keine wesentlichen Unterschiede bestehen und insbesondere eine chemische Unterscheidung zwischen beiden nicht geführt werden kann, hat neuerdings Auzinger (a. a. O.) festgestellt, daß ein Zuckerfütterungshonig ganz andere biologische Eigenschaften besitzt, als ein gewöhnlicher Blütenhonig und daß eine Unterscheidung auf biochemischem Wege möglich ist. Außerdem handelt es sich im besprochenen Falle nicht um ein Fütterungserzeugnis von Rohrzucker, sondern von Invertzucker, welches Zuckerzersetzungsprodukte enthält und an diesen Stoffen chemisch leicht erkennbar ist. Ob daher das Reichsgericht bei einer Invertzuckerfütterung und bei Zugrundelegung der neueren Forschungen zu dem gleichen Ergebnis hinsichtlich der Beurteilung der Zuckerfütterungshonige gelangen würde, ist zum mindesten sehr zweifelhaft. Lührig[2]) geht aber noch weiter. Er verwirft auch die von einem von uns (Fiehe) ausgearbeitete Stärkesirupreaktion unter Hinweis auf obige Entscheidung des Reichsgerichts und mit der Begründung, daß nach seinen Versuchen die Dextrine des Stärkesirups in das Fütterungserzeugnis übergehen. Da ein Erzeugnis der Biene, das von einer Fütterung mit Stärkesirup herrührt eine ganz andere chemische Zusammensetzung besitzt, als Honig und sich grundsätzlich von diesem durch das Fehlen der Fruktose und durch die Gegenwart der Stärkedextrine

[1]) Pharmaz. Zentralhalle 1909, **50**, 355.
[2]) Pharmaz. Zentralhalle 1909, **50**, 605.

unterscheidet, so kann die Anwendbarkeit der Reichsgerichtsentscheidung auf diese Erzeugnisse gar nicht in Frage kommen. Uns erscheinen im Gegenteil die Reaktionen zum Nachweis von Invertzucker und Stärkesirup um so wertvoller, als sie auch sogenannte „Fälschungen auf der Biene" erkennen lassen.

Nach Bekanntgabe des Invertzuckernachweises mit Resorzinsalzsäure sind eine Reihe von Parallelreaktionen veröffentlicht worden. Der Weg zur Auffindung solcher Reaktionen war gegeben, nachdem bekannt war, daß die Reaktion auf der Anwesenheit von Oxymethylfurfurol beruhe. Von diesen Reaktionen sind insbesondere zu nennen die Verfahren von Jägerschmid[1]), Feder[2]) und Armani und Barboni[3]).

Jägerschmid zieht den Honig mit Aceton aus und setzt diesem Auszug ein gleiches Volumen konzentrierter Salzsäure zu. Bei Gegenwart von künstlichem Invertzucker soll sofort eine violettrote oder karmoisinrote Färbung auftreten. Reine Honige geben hierbei eine bernsteingelbe Farbe. Das Verfahren ist von verschiedener Seite nachgeprüft worden. Witte[4]) hält es für wenig brauchbar, weil die Färbungen nicht charakteristisch genug sind, während Reinhardt[5]) gute Erfolge mit der Methode erzielt hat.

Feder verreibt den Honig mit frisch bereiteter Anilinchloridlösung, bis die ganze Masse homogen geworden ist. Bei positiver Reaktion wird die Mischung prachtvoll himbeer- bis kirschrot, bei negativer Reaktion ist die Farbe hellgelb bis schmutzig braun. Hasterlik[6]) hat mit der Methode einige Versuche angestellt und hält sie für wertvoll.

Armani und Barboni verwenden zum Nachweis des Kunsthonigs essigsaures Benzidin. Eine 20%ige Verfälschung des Honigs mit Invertzucker soll noch an der tiefgelben Farbe, welche nach Zusatz des Reagens auftritt, erkennbar sein. Die von Hasterlik mit dieser Methode erzielten Ergebnisse sind aber wenig ermutigend gewesen.

Endlich ist noch die von Browne[7]) angegebene Anilinacetat-Probe zu nennen. Nach dieser Probe werden 5 ccm einer konzentrierten Honiglösung (1 + 1) mit 1—2 ccm einer Mischung von 5 ccm Anilin, 5 ccm Wasser und 2 ccm Eisessig überschichtet. Bei Gegenwart von künstlichem Invertzucker soll an der Berührungsstelle der beiden Flüssigkeiten ein roter Ring entstehen, während bei reinen Honigen sich keine Färbungen bemerkbar machen.

Browne führt die Reaktion auf die Gegenwart geringer Mengen Furfurol im Invertzucker zurück und bemerkt, daß auch Honige, die auf hohe Temperaturen erhitzt wurden, die Reaktion geben können.

Witte[8]) hat dies Verfahren nachgeprüft und günstig beurteilt. Er meint aber, daß die Reaktion mit Resorzinsalzsäure weit charakteristischer sei.

---

[1]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **17**, 671.
[2]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **22**, 411.
[3]) Chem. Ztg. 1911, **35**, 383.
[4]) A. a. O.
[5]) A. a. O.
[6]) Leipziger Bienenzeitung 1912, Heft 2, S. 19.
[7]) Zeitschr. d. Ver. Deutscher Zuckerind. 1908, **45**, 751.
[8]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **18**, 625.

Wir ziehen unsererseits vor, die Reaktion in der von dem einen von uns angegebenen und vorstehend nochmals erläuterten Form auszuführen.

VII. Prüfung auf Stärkesirup und Stärkezucker.

Die Methoden, welche zur Prüfung auf Stärkesirup und Stärkezucker im Honig Verwendung finden, beruhen vorzugsweise auf dem Nachweis der Stärkedextrine. Dieser Nachweis wird dadurch erschwert, daß auch im Honig dextrinartige Verbindungen mit ähnlichen Eigenschaften wie die Dextrine des Stärkesirups vorkommen. Insbesondere sind die Honigtau- und Koniferenhonige reich an derartigen Verbindungen.

Nach den „Vereinbarungen" soll die Menge der vorhandenen Dextrine Aufschluß darüber geben, ob eine Verfälschung des Honigs mit Stärkesirup oder Stärkezucker vorliegt. Die unter Zusatz von Nährsalzlösung mit reingezüchteter Weinhefe vergorene Honiglösung wird auf ihre optische Drehung geprüft und, falls erhebliche Rechtsdrehung vorhanden ist, mit Alkohol auf Dextrin geprüft. Beträgt die Rechstdrehung der 10%igen vergorenen Honiglösung mehr als + 3 Bogengrade bei Anwendung des 200 mm-Rohres und fällt die qualitative Dextrinreaktion positiv aus, so wird auf einen Zusatz von Stärkesirup oder Stärkezucker zum Honig geschlossen. Dasselbe ist der Fall, wenn die nach dem Vergären der Honiglösung quantitativ ermittelte Dextrinmenge mehr als 10% beträgt. Hierzu ist folgendes anzuführen.

Die spezifische Drehung $[\alpha]_D$ der im Stärkesirup enthaltenen Dextrine liegt zwischen + 170 und 196°. Demnach wird 1 g Stärkedextrin in 100 ccm Wasser gelöst im 200 mm-Rohr eine Rechtsdrehung von + 3,4 bis 3,92° aufweisen. Die spezifische Drehung der Honigdextrine ist dagegen geringer. Hilger und Wolff[1]) fanden die spezifische Drehung $[\alpha]_D$ bei 4 Proben zu + 157, 131,28, 125,59 und 119,9°. 1 g dieser Honigdextrine, in 100 ccm Wasser gelöst, wird demnach im 200 mm-Rohr etwa + 2,4 bis + 3,1° drehen.

Eine Rechtsdrehung der 10%igen vergorenen Honiglösung von + 3 Bogengraden würde danach auf einen Dextringehalt von etwa 10% hinweisen. Da aber nach Untersuchungen von Hilger und Wolff die Honigdextrine von Weinhefe angegriffen werden (nur das Dextrin $[\alpha]_D = + 157°$ erwies sich als beständig gegenüber Weinhefe) und je nach der Beschaffenheit bis zu 50% vergoren werden, so wird eine Drehung der mit Weinhefe vergorenen 10%igen Honiglösung von + 3 Bogengraden in den meisten Fällen einem bedeutend höheren ursprünglich im Honig vorhanden gewesenen Dextringehalt als 10% entsprechen. Anders liegen aber die Verhältnisse, wenn die Dextrine nicht dem Honig sondern dem Stärkesirup entstammen. Diese Dextrine werden durch Weinhefe nicht oder nur unbedeutend angegriffen und befinden sich somit zum weitaus größten Teil im Gärungsrückstand. Bei Zugrundelegung der spezifischen Drehung $[\alpha]_D$ + 170 bis 196° würde eine Rechtsdrehung der 10%igen vergorenen Lösung von + 3° etwa 0,7—0,9 g Stärkedextrin und bei Annahme von etwa 40% Dextrin im Stärkesirup 1,8—2,2 g Stärkesirup entsprechen. Ein Stärkesirupzusatz von 18—22% zum Honig würde somit auf Grund der obigen Methode

[1]) Zeitschrift f. Untersuchung d. Nahr.- u. Genußm. 1904, 8, 110.

nicht erkannt werden können, weil entsprechende Drehungen auch durch die natürlichen Dextrine des Honigs hervorgerufen werden.

Indem somit die „Vereinbarungen" einerseits der Tatsache Rechnung tragen, daß die vergorene Honiglösung noch etwa 10% natürliche Dextrine enthalten kann, mußte anderseits auf die Erkennung und Beanstandung von etwa 20% Stärkesirup mit Hilfe dieser Methode verzichtet werden. Von der „Freien Vereinigung" ist vorgeschlagen worden, schon eine Rechtsdrehung der 10%igen vergorenen Honiglösung von mehr als + 1 Kreisgrad zu beanstanden. Unter der Annahme, daß etwa 50% des Honigdextrins vergoren würden, wären dann Honigdextrinmengen von etwa 7% und darüber im Honig verdächtig. Andrerseits könnte ein Stärkesirupzusatz zum Honig von über 6% auf Grund der Methode erkannt werden. Im Tannenhonig sind nun aber vielfach 10% und mehr Honigdextrin beobachtet worden. So fand Schaffer[1]) in 4 Coniferenhonigen 14,77; 15,53; 16,41 und 16,79% Dextrin (einschließlich der geringfügigen Menge an Stickstoffsubstanz, Wachs usw.). In 5 weiteren authentisch reinen Honigen fand er 14,38; 13,52; 13,04; 14,92 und 13,63% Dextrin. Ähnliche Ergebnisse werden von anderen Forschern berichtet.

Im Hinblick hierauf soll zur Bestätigung des Verdachtes eines Stärkesirupzusatzes zum Honig das spezifische Drehungsvermögen der Dextrine ermittelt und die Beckmannsche Reaktion[2]) ausgeführt werden. Die spezifische Drehung darf nicht gleich oder ähnlich der spezifischen Drehung der Dextrine des Stärkesirups ($[\alpha]_D = +170$ bis $+193^0$) sein, und nach der Reaktion von Beckmann dürfen nicht mehr als Spuren eines Niederschlages erhalten werden. Es erscheint aber zweckmäßig, die letzteren Methoden sofort zur Anwendung zu bringen und nicht erst dann, wenn die Drehung der 10%igen vergorenen Honiglösung über $+1^0$ beträgt. Als Vorprobe könnte eine qualitative Dextrinreaktion und als Bestätigungsprobe die Feststellung des spezifischen Drehungsvermögens der Dextrine dienen.

Für die qualitative Dextrinprobe kann außer der bekannten Methode von Beckmann[2]) ein von dem einen von uns (Fiehe) ausgearbeitetes Untersuchungsverfahren[3]) zur Unterscheidung der Honig- und Stärkedextrine in Frage kommen. Das Verfahren besteht darin, daß Honigdextrine bei Gegenwart von Salzsäure durch Alkohol nicht gefällt werden, während Stärkedextrine unter den gleichen Bedingungen zur Ausfällung gelangen. Versetzt man 1 ccm der mit Gerbsäure vom Eiweiß befreiten 33⅓%igen Honiglösung mit 2 Tropfen konzentrierter Salzsäure und 10 ccm absolutem Alkohol, so tritt bei Gegenwart von Dextrinen des Stärkesirups und Stärkezuckers eine milchige Trübung ein, während bei Abwesenheit dieser Dextrine die Lösung klar oder doch fast klar bleibt. Das Verfahren ist von Witte[4]) nachgeprüft worden und hat sich gut bewährt. Auch Petri[5]) wendet die Methode mit gutem Erfolg an. Fellenberg[6]),

[1]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1908, **15**, 604.
[2]) Zeitschr. anal. Chem. 1896, **35**, 263; Zeitschr. f. Unt. d. Nahr. u. Genußm. 1901, **4**, 1065.
[3]) Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte 1909, **32**, 218.
[4]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **21**, 305.
[5]) Jahresbericht d. Nahrungsmittel-Untersuchungsamtes Coblenz 1909.
[6]) Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene. Veröffentl. vom Schweiz. Gesundheitsamt 1911, **2**, 161.

welcher die Methode an einer Reihe von Schweizerhonigen nachprüfte, die sehr reich an Honigdextrinen waren, bezeichnet die Reaktion als sehr empfindlich, einfach und sicher. Wir beobachteten bei der Untersuchung von 112 Auslandshonigen, worunter sich auch Tannenhonige befanden, in keinem Falle Trübungen, die zu Zweifeln Anlaß gaben. Ein Stärkesirupzusatz von nur 5 % konnte dagegen im Tannen- und Blütenhonig mit Sicherheit erkannt werden. Die Methode bietet gegenüber dem Verfahren von Beckmann unter anderem in den Fällen Vorteile, in denen es sich um Untersuchung stark eiweißhaltiger Honige handelt. Diese Honige geben mit dem Beckmannschen Reagens (Barytlauge und Methylalkohol) starke Fällungen, während sie mit Salzsäurealkohol völlig klar bleiben.

Aus unseren Untersuchungsergebnissen seien folgende angeführt:

Tabelle XXIII.

Ausfall der Prüfung auf Stärkesirup nach Beckmann und Fiehe.

Laufende Nr.	Optische Drehung[1])		Prüfung auf Stärkesirup		Eiweißfällung nach Lund
	vor der Inversion	nach der Inversion	nach Beckmann	nach Fiehe	ccm
108	— 1,81	— 2,22	sofort starke Fällung	klar	1,30
109	— 1,01	— 1,40	„ „ „	„	2,60
110	— 0,66	— 0,93	„ „ „	„	2,40
111	— 0,80	— 1,27	„ „ „	„	4,35
112	— 2,40	— 2,56	„ „ „	„	4,20

Bei den Honigen Nr. 109—112 wird die starke Fällung mit dem Reagens von Beckmann zweifellos mit der großen Menge der fällbaren Eiweißstoffe in Zusammenhang stehen. Beim Honig Nr. 108 ist dagegen die Eiweißfällung nach Lund nicht ungewöhnlich hoch; der Ausfall der Beckmannschen Prüfung scheint daher noch von andern Stoffen als Eiweißstoffen ungünstig beeinflußt zu werden.

Vor kurzem sind einige Fälle bekannt geworden, in denen auch anscheinend echte Honige mit Salzsäure-Alkohol Trübungen und Fällungen gaben. So berichtet Rosenthaler[2]) in seiner Abhandlung „Über die Mutarotation des Honigs", von einem Tannenhonig, bei dem die Reaktion positiv ausfiel. Da der Honig in Gegenwart eines von Rosenthaler Beauftragten geschleudert wurde, so hält er ihn für frei von Stärkesirup. Bei den übrigen 40 Honigen, unter denen sich zahlreiche rechtsdrehende Tannenhonige befanden, fiel die Reaktion stets negativ aus. Auch Voermann und Bakker[3]) finden unter 37 Honigen des Inlands und Auslands 2 Proben, von denen die eine eine schwache, die andere eine sehr deutliche Trübung mit Salzsäure-Alkohol zeigte. Die sonstige Zusammensetzung der Honige gab keinen Anhalt dafür, daß eine Verfälschung mit Stärkesirup vorlag, was aber immerhin noch nicht ausschließt, daß

[1]) im 200 mm-Rohr in Kreisgraden (10 g Honig zu 100 ccm).
[2]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, 22, 644.
[3]) Chemisch Weekblad 1911, 8, 784.

die Bienen geringe Mengen von Stärkesiruppräparaten eingetragen haben, wie dies bei Gelegenheit der Abhaltung von Jahrmärkten wiederholt beobachtet ist. Bei der Feinheit der Reaktion werden auch Stärkesirupmengen von nur 5 % angezeigt, deren Erkennung mit anderen Methoden kaum möglich ist. Nach Untersuchungen von Lührig[1]) geben auch die Fütterungserzeugnisse der Bienen mit Stärkesirup positive Alkoholsalzsäurereaktionen.

Von König und Karsch[2]) ist eine Untersuchungsmethode für die Prüfung auf Stärkesirup im Honig in Vorschlag gebracht worden, die auf dem Nachweis der Glykose des Stärkesirups beruht. Die Forscher gehen von der Voraussetzung aus, daß ein reiner Honig seine Rechtsdrehung nur einem natürlichen Dextringehalt, unter Umständen in Verbindung mit Saccharose verdanken kann. Nach Entfernung der Dextrine mit Alkohol müsse daher reiner Honig linksdrehend werden. Verbleibende Rechtsdrehung sei entweder einem hohen Glykosegehalt, herrührend aus dem Stärkesirup, oder aber auch einem hohen Saccharosegehalt zuzuschreiben. Saccharose werde nach der Inversion linksdrehend und könne so von der Glykose unterschieden werden.

Dieses Verfahren, welches in die „Vereinbarungen" Aufnahme gefunden hat, bietet dann Vorteile gegenüber den bereits genannten Methoden, wenn der zur Fälschung benutzte Stärkesirup arm an Dextrinen ist.

Die Methode hat sich bei der Nachprüfung als wertvoll erwiesen. Als beweisend für einen Stärkesirupzusatz zum Honig kann sie jedoch nicht angesehen werden, da einerseits mit der Möglichkeit zu rechnen ist, daß eine Anreicherung der Glykose durch eine unrichtige Probeentnahme des Honigs (unter teilweiser Entmischung) erfolgt ist, und anderseits Honige mit natürlichem hohem Glykosegehalt vorkommen. So wurde von Browne (a. a. O.) ein von Ackerminze stammender Honig mit 23,35 % Fruktose und 46,40 % Glykose beobachtet.

Es erscheint daher zweckmäßig, den Nachweis des Stärkesirups im Honig in erster Linie auf die Eigenschaften der Stärkedextrine zu gründen.

Für die quantitative Bestimmung des Stärkesirups im Honig fehlt es bisher an einem geeigneten Verfahren. Die Methode von Juckenack und Pasternack[3]), zur quantitativen Bestimmung von Stärkesirup in Fruchtsäften, welche auf der Erwägung beruht, daß einerseits der Gehalt des Stärkesirups an Dextrin und Glykose und daher die spezifische Drehung der invertierten Trockensubstanz des Stärkesirups nur wenig schwankt, anderseits der Extraktgehalt der reinen Fruchtsirupe nur aus Invertzucker und Rohrzucker besteht, läßt sich für Honig nicht anwenden, weil die Honige natürliche Dextrine in wechselnden Mengen enthalten und daher die spezifische Drehung der invertierten Trockensubstanz sehr großen Schwankungen unterworfen ist. Zur Erzielung von Annäherungswerten wird vielleicht das Verfahren von Beckmann (a. a. O.), wonach der mit Barytlauge und Methylalkohol erhaltene Dextrinniederschlag quantitativ bestimmt wird, gute Dienste tun.

---

[1]) Pharmaz. Zentralhalle 1909, **50**, 605.
[2]) Zeitschr. analyt. Chem. 1895, **34**, 1.
[3]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1904, **8**, 10.

Im Anschluß hieran sei auf ein von A. Volant[1]) bekannt gegebenes neues Verfahren zur Ermittelung von Handelsdextrinen in Nahrungsmitteln hingewiesen. Das Verfahren beruht auf der bereits erwähnten (S. 328) Methode von Lemeland[2]), wonach die verschiedenen Mono- und Disaccharide beim Erhitzen mit alkalischer Wasserstoffsuperoxydlösung inaktiv werden, während Saccharose und Dextrine mit starker Rechtsdrehung (die mit geringer Drehung werden abgebaut) unter den gleichen Bedingungen ihre Drehung behalten. Um die bei dieser Bestimmung störende Saccharose unschädlich zu machen, wird sie zunächst durch Erhitzen mit Salzsäure auf dem Wasserbade invertiert und dann mit Alkali und Wasserstoffsuperoxyd inaktiviert. Der Dextringehalt wird aus der Drehung berechnet.

Die Verwendbarkeit dieses Verfahrens beim Honig wird von dem Verhalten der Honigdextrine gegen alkalische Wasserstoffsuperoxydlösung abhängig sein. Werden die Honigdextrine bei dieser Behandlung inaktiv, so ist das Verfahren voraussichtlich geeignet, eine Unterscheidung zwischen Stärke- und Honigdextrin herbeizuführen, und demnach zur annähernden Bestimmung von Stärkedextrin im Honig brauchbar. Werden aber die Honigdextrine nicht inaktiv, so ist das Verfahren für diesen Zweck nicht verwendbar.

VIII. Prüfung auf diastatische Fermente.

Wie bereits bei Besprechung des Nachweises von künstlichem Invertzucker ausgeführt worden ist (S. 337), kann die Erhitzung eines Honigs auf hohe Temperaturen mit Hilfe der diastatischen Fermente nach dem Verfahren von Auzinger erkannt werden.

Wir prüfen die Honige in der Weise, daß eine Reihe von Probiergläsern mit je 5 ccm einer frisch bereiteten 20%igen Honiglösung beschickt und nach Zugabe von je 1 ccm einer 1%igen Lösung von löslicher Stärke im Wasserbade bei 40° erwärmt wird. Nach je 5 Minuten wird ein Probierglas aus dem Wasserbad genommen, es werden einige Tropfen Jod-Jodkaliumlösung (1 g Jod und 2 g Jodkalium in 300 ccm Wasser gelöst) hinzugefügt und die entstehende Färbung beobachtet. Ist der Honig nicht auf hohe Temperaturen erhitzt worden, so macht sich schon nach 5 Minuten die Verzuckerung der Stärke bemerkbar und nach 30 Minuten ist in den meisten Fällen keine Stärke mehr nachzuweisen. Die Farbe geht je nach dem Stande der Verzuckerung allmählich von tiefblau in rotbraun und hellgelb bis gelbgrün über. Stark erhitzte Honige geben bei der gleichen Behandlung die tief violettblaue Färbung der Jodstärke. Da die meisten Honige jodbindende Eigenschaften besitzen, so dürfen nur die sofort nach Zugabe der Jodlösung auftretenden Färbungen als kennzeichnend angesehen werden. Zur Feststellung, bei welchen Wärmegraden die Diastase zerstört wird, erhitzten wir 4 verschiedene Honigproben in Mengen von etwa 50 g je eine Stunde auf 70°, dann auf 80, 85 und 90°.

Es ergab sich folgendes:

---

[1]) Annal. d. Falsific. 1911, **4**, 504.

[2]) Journal de Pharmacie et de Chimie 1910, [7], **2**, 298 und Annal. d. Falsific. 1911, **4**, 32.

Tabelle XXIV. Diastase in erhitzten Honigen.

Nr. des Honigs	1. Stunde auf 70° erwärmt	noch 1 Std. auf 80° erwärmt	noch 1 Std. auf 85° erwärmt	noch 1 Std. auf 90° erwärmt
48	Diastase vorhanden aber gering geschwächt	Diastase geschwächt	Diastase stark geschwächt	Diastase zerstört
49	„ „	„ „	„ „	„ „
51	„ „	„ „	„ „	„ „

Folgende Farbenerscheinungen wurden bei der Ausführung dieser Diastaseproben beobachtet:

Tabelle XXV. Verhalten erhitzter Honige bei der Diastaseprüfung.

Nr. des Honigs	Reaktion nach Minuten	nicht erhitzt	1 Stunde auf 70° erhitzt	noch 1 Std. auf 80° erhitzt	noch 1 Stunde auf 85° erhitzt	noch 1 Stunde auf 90° erhitzt
48	5	rötlichbraun	rötlichbraun	violettblau	blau	tiefblau
	10	„	„	„	—	
	15	hellgelb	hellgelb	violett	blau	
	30	—	—	rötlichbraun	blau m. violett. Stich	
	60	—	—	hellgelb	rötlich violett	
	105	—	—	—	gelbrot	
49	5	hellgelb	rötlichbraun	—	—	tiefblau
	10	—	schwach rötlichbraun	—	—	
	15	—	hellgelb	hellgelb	blau	
	30	—	—	—	blau m. violett. Stich	
	60	—	—	—	„	
	105	—	—	—	rötlich m. viol. Stich	
51	5	rötlichbraun	—	—	—	tiefblau
	10	hellbraun	—	—	—	
	15	hellgelb	schwach rotbraun	rotbraun	blau	
	30	—	hellgelb	hellgelb	blau m. violett. Stich	
	60	—	—	—	„	
	120	—	—	—	rötlich m. viol. Stich	

Hieraus ergibt sich, daß die Diastase bei Temperaturen von 85—90° zugrunde geht. Unsere früheren Beobachtungen, wonach Honige, die 3 Stunden auf 80 bis 83° erhitzt waren, noch diastatische Fermente enthielten, wurden also durch obige Versuche bestätigt.

Auzinger gibt nun in seiner ersten Abhandlung an, daß die Diastase des Honigs bei Hitzegraden von über 70° zugrunde gehe. In seiner zweiten Arbeit weist er sogar nach, daß die Diastase schon bei Temperaturen von 50—60° zerstört wird. Die Versuchsanstellung Auzingers ist aber von der unsrigen verschieden und entspricht nicht der Praxis. Er erhitzt nicht den Honig, sondern die $33^1/_3$%ige Honiglösung. Die Diastase scheint demnach in verdünnteren wässerigen Lösungen gegen hohe Wärmegrade weit empfindlicher zu sein, als in konzentrierten Zuckerlösungen.

Der Invertzucker des Honigs oder aber die Eiweißstoffe üben gewissermaßen eine Schutzwirkung auf die Diastase aus. Wir beobachteten auch, daß wässerige Honiglösungen nach 24stündigem Stehen bei gewöhnlicher Temperatur ihre diastatischen Eigenschaften völlig verloren hatten. Eine frische Bereitung der Honiglösung ist daher für die Prüfung auf Diastase unbedingt erforderlich. Die Feststellung, daß die Diastase in unverdünntem Honig erst bei 85—90° C zerstört wird, erscheint uns um so wichtiger, als derartige Temperaturen im Großhandel zum Umschmelzen der Honige weder üblich noch erforderlich sind. Unter der Voraussetzung, daß alle Honige Diastase enthalten, würde also deren Abwesenheit auf eine übermäßige Erhitzung des Honigs hinweisen. Da nach Untersuchungen von Langer[1]) die Fermente des Honigs tierischen Ursprungs sind und vornehmlich dem Bienenspeichel entstammen, so kann es auch keinem Zweifel unterliegen, daß nicht erhitzte Honige Diastase enthalten müssen. Es besaßen auch die uns zur Verfügung stehenden Auslandshonige, soweit sie nicht übermäßig erhitzt waren, sämtlich diastatische Eigenschaften.

Die von v. Raumer[2]) für die „Vereinbarungen" vorgeschlagene Marpmannsche Peroxydasenreaktion mit Paraphenylendiamin und Wasserstoffsuperoxyd zum Nachweis erhitzter Honige, ist nach Untersuchungen von Auzinger (a. a. O.) eine einfache chemische Reaktion, die durch die Fruktose des Honigs hervorgerufen wird und daher zum Nachweis und zur Unterscheidung erhitzter und nicht erhitzter Honige völlig unbrauchbar. v. Raumer[3]) hat ja auch selbst mit der Marpmannschen Probe die schlechtesten Erfahrungen gemacht.

IX. Prüfung auf Eiweißstoffe nach dem Verfahren von Lund[4]).

Lund verwendet zur Ausfällung der Eiweißstoffe im Honig 0,5%ige Gerbsäurelösung. Für die Messung des Niederschlages dienen Röhren von 35 cm Länge, 16 mm Weite im oberen Teil und 8 mm Weite im unteren Teil. Der Übergang vom oberen zum unteren Teil der Röhre soll sich auf etwa 4 cm Länge verteilen. Der untere Teil, welcher etwa 4 ccm faßt, ist in zehntel ccm eingeteilt. Der obere Teil trägt Marken bei 20, 25 und 40 ccm.

Es werden 10 ccm einer 20%igen filtrierten Honiglösung in die Röhre gegeben, mit Wasser auf 35 ccm aufgefüllt und 5 ccm einer 0,5%igen Gerbsäurelösung unter vorsichtigem Umschwenken hinzugefügt. Nach 24stündigem Stehen wird das Niederschlagsvolumen abgelesen. Falls sich der Niederschlag nicht im unteren Teil der Röhre sammelt, wird durch Drehen der Röhre um ihre Längsachse nachgeholfen. Reine Honige sollen nach Lund 1,4—2,3 ccm Niederschlag geben. Bei Kunsthonigen soll dagegen die Niederschlagsmenge zwischen 0 und 0,3 ccm schwanken.

Neuerdings verwendet Lund zur Fällung der Eiweißstoffe Phosphorwolframsäure, weil die hiermit erzielten Niederschläge kompakter sind und ihr Volum besser ablesbar

---

[1]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1902, **5**, 1204, ferner Archiv f. Hygiene 1909, **71**, 308.

[2]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1908, **16**, 21.

[3]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **17**, 122.

[4]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **17**, 128, ferner Mitteilungen a. d. Gebiete d. Lebensmittelunters. u. Hygiene, veröff. v. Schweizer Ges.-Amt 1910, **1**, 38.

ist. Das Reagens besteht aus einer Mischung von 2,0 g Phosphorwolframsäure, 20 ccm verdünnter Schwefelsäure (1 + 4) und 80 ccm Wasser. Bei reinen Honigen soll die Niederschlagsmenge 0,6—2,7 ccm und im Mittel 1,1 ccm betragen.

Das Verfahren ist von Witte (a. a. O.) nachgeprüft worden. Er stellte für reine Honige als unterste Grenze 0,9 ccm Gerbsäurefällung und 0,6 ccm Phosphorwolframsäurefällung fest. Nach Untersuchungen von Reinhardt (a. a. O.) ist dagegen die Lundsche Fällung weit größeren Schwankungen unterworfen. Er glaubt die Tanninfällung für die Beurteilung nur dann heranziehen zu dürfen, wenn die Niederschlagsmenge 0—0,4 ccm beträgt. Th. Nußbaumer[1]) beobachtete bei überseeischen Honigen als äußerste Grenze 0,28 ccm Gerbsäureniederschlag. Bei Heideblütenhonig wurde von Kappeller und Gottfried[2]) 6 ccm Fällung festgestellt. Lendrich und Nottbohm[3]) bekamen bei zwei Auslandshonigen überhaupt keine Abscheidung, sondern nur eine schwache Trübung. Bei den übrigen 61 Auslandshonigen schwankte die Menge des erhaltenen Niederschlages zwischen 0,1 und 3,6 ccm und betrug im Durchschnitt 0,96 ccm. Es konnte ferner eine gewisse Gesetzmäßigkeit zwischen der Höhe der Eiweißfällung nach Lund und dem Gehalt an Stickstoffsubstanz bei Honig aus den einzelnen Ursprungsländern festgestellt werden. Bei Honigen aus Hawaii, Italien, Kalifornien, Mexiko und Frankreich stieg mit zunehmendem Stickstoffgehalt auch die Fällung nach Lund. Bei den Honigen aus Chile und Jamaika fiel im Verhältnis zur Stickstoffsubstanz die Abscheidung nach Lund zu niedrig aus. Die Honige von Haiti, Peru und San Domingo nahmen eine Mittelstellung ein.

Bei unseren Untersuchungen der Auslandshonige wurde bei Verwendung von Phosphorwolframsäure 0,37 bis 4,33 ccm Niederschlag gemessen. Die Angaben Reinhardts, wonach die Lundsche Fällung innerhalb weiter Grenzen schwankt, konnten wir somit bestätigen. Damit erscheint auch der Wert des Verfahrens in Frage gestellt. Es liegt jedenfalls die Möglichkeit vor, einem Invertzucker durch geringe Beimischungen eines stark eiweißhaltigen Honigs normale Mengen fällbarer Eiweißstoffe zu geben. Da Kunsthonige vorzugsweise unter Zusatz von Heidehonig hergestellt werden, so werden diese Erzeugnisse auch zumeist nach Lund normal reagieren.

Unter diesen Verhältnissen dürfte es zweckmäßig sein, dem Lundschen Verfahren keine zu große Bedeutung zuzumessen. In den Fällen, in welchen die stickstoffhaltigen Bestandteile zur Beurteilung herangezogen werden sollen, wird die Bestimmung des Gesamtstickstoffes nach dem Verfahren von Kjeldahl bessere Dienste tun, als die Bestimmung der fällbaren Eiweißstoffe nach Lund.

Zusammenfassung.

Die vorstehenden Darlegungen lassen sich in folgende Schlußsätze zusammenfassen:

1. Für die genaue Ermittelung des Trockenrückstandes im Honig kann nur die gewichtsanalytische Bestimmung — unter näher angegebenen Bedingungen —

---

[1]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **20**, 272.
[2]) Jahresbericht Magdeburg 1910, S. 20.
[3]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **22**, 633.

Verwendung finden. Für die indirekte Bestimmung des Trockenrückstandes aus der Dichte der Honiglösung kann nur die Rohrzuckertafel von Windisch oder eine entsprechende Formel benutzt werden. Diese Bestimmungsmethode gibt nur Annäherungswerte.

2. Bei der Bestimmung der freien Säure des Honigs ist empfindliches blauviolettes Lackmuspapier als Indikator zu wählen. Mit Rücksicht darauf, daß Ameisensäure im Honig nicht einwandfrei nachgewiesen ist, erscheint es angebracht, die Säuremenge nicht als Ameisensäure, sondern in Kubikzentimetern Normallauge auszudrücken.

3. In der Honigasche kann mit der Bestimmung der Alkalität bequem eine einfache acidimetrische Titration der Phosphate verbunden werden. Für die Beurteilung des Honigs erscheint die Ermittelung der Phosphate wertvoll.

4. Für die Zuckerbestimmung mit Fehlingscher Lösung ist es gleichgültig, ob das Kupfer als Metall oder als Oxyd gewogen wird.

5. Der Rohrzucker des Honigs ist gewichtsanalytisch zu bestimmen; die polarimetrische Methode ergibt nur Annäherungswerte.

6. Zum Nachweis von künstlichem Invertzucker im Honig ist die Methode von Ley auf Grund theoretischer Überlegungen und praktischer Erfahrungen an Auslandshonigen nicht geeignet.

Die Fiehesche Reaktion hat sich, besonders auch in Verbindung mit dem Diastasenachweis, gut bewährt.

7. Bei der Prüfung des Honigs auf Stärkesirup und Stärkezucker hat sich das Verfahren nach Fiehe als einfach und sicher erwiesen.

8. Der Nachweis einer Erhitzung des Honigs auf Temperaturen über 85° kann mit Hilfe der Diastaseprobe mit Sicherheit geführt werden.

9. Der Bestimmung der fällbaren Eiweißstoffe nach Lund kann eine wesentliche Bedeutung für die Beurteilung des Honigs nicht zugesprochen werden.

Berlin, Chemisches Laboratorium des Kaiserl. Gesundheitsamtes, im März 1912.

Anhang.

Wichtigere Abhandlungen aus dem Gebiete der Honiguntersuchung von 1898 bis 1912.

1. R. Frühling, Zur Polarisation des Honigs. Zeitschr. öffentl. Chem. 1898, **4**, 410.

2. P. Degener, Über Tafelhonig. Pharmaz. Ztg. 1898, **43**, 427; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1899, **2**, 162.

3. Kgl. Belgische Verordnung vom 27. April 1896. Veröff. d. Kaiserl. Gesundheitsamts 1897, **21**, 1047; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1898, **1**, 372.

4. H. Gühler, Über Tafelhonig und dessen Herstellung. Zeitschr. öffentl. Chemie 1898, **4**, 476; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußmittel 1899, **2**, 162.

5. Tony Kellen, Farbe und Geschmack einiger Honigsorten. Luxemb. Bienenztg. 1898; Apotheker Ztg. 1898, **13**, 382.

6. C. Hoitsema, Honiganalyse. Zeitschr. analyt. Chem. 1899, **38**, 439; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1900, **3**, 365.

7. O. Haenle, Beitrag zur Kenntnis des Honigs. Pharm. Ztg. 1899, **44**, 742; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1900, **3**, 366.

8. A. Bömer, Gefärbter Honig. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1901, **4**, 364.

9. Heckmann, Über gefärbten und gefälschten Honig. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1901, **4**, 543.

10. E. Beckmann, Zur Kenntnis des sogenannten Honigdextrins. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1901, **4**, 1065.

11. A. Hilger, Zur Untersuchung und Beurteilung des Honigs. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1901, **4**, 1143.

12. W. Bräutigam, Ein Beitrag zur Honigprüfung. Pharmaz. Ztg. 1902, **47**, 109; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1902, **5**, 622.

13. H. Ley, Über Honig von zitronengelber Farbe. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1901, **4**, 828.

14. Derselbe, Mel und Mel depuratum D. A. B. IV. Pharmaz. Ztg. 1902, **47**, 227; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1902, **5**, 623.

15. R. Frühling, Honiganalysen. Zeitschr. f. öffentl. Chemie 1901, **7**, 385; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1902, **5**, 623.

16. J. Langer, Zur Beurteilung des Honigs mittels der in ihm nachweisbaren Fermente. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1902, **5**, 1204.

17. A. Beythien, Honig. Jahresbericht Dresden 1900, S. 8.

18. Denkschrift über den Verkehr mit Honig. Ausgearbeitet im Kaiserl. Gesundheitsamte. Berlin 1903.

19. A. Beythien, H. Hempel, P. Bohrisch, Über Honig. Jahresbericht. Dresden 1902. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1903, **6**, 554.

20. J. Langer, Fermente im Bienenhonig. Schweizer Wochenschr. Chem. Pharm. 1903, **41**, 17; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1903, **6**, 1010.

21. E. von Raumer, Über den Einfluß der Fütterung von Rohrzucker und Stärkesirup auf die Beschaffenheit des Honigs. Zeitschr. analyt. Chem. 1902, **41**, 333; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1903, **6**, 1010.

22. O. Haenle und A. Scholz, Über die rechtsdrehenden Körper im Tannenhonig. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1903, **6**, 1027.

23. H. Leffmann, Notiz über Honig. Analyst 1902, **27**, 355; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1903, **6**, 1011.

24. G. v. Rigler, Die Serodiagnose in der Untersuchung der Nahrungsmittel. Österr. Chem. Ztg. 1902, **5**, 97.

25. R. Racine, Etwas über Honiguntersuchung und Honigverfälschung. Zeitschr. öff. Chem. 1902, **8**, 281; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1903, **6**, 1012.

26. G. Marpmann, Beiträge zur Honiguntersuchung. Schweizer Wochenschr. Chem. Pharm. 1902, **40**, 590; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1903, **6**, 1012.

27. Derselbe, Zur Honiguntersuchung. Pharmaz. Ztg. 1902, **47**, 748; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1903, **6**, 1012.

28. A. Hilger u. P. Wolff, Zur Kenntnis der im rechtsdrehenden Coniferenhonig vorkommenden Dextrine. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1904, **8**, 110.

29. K. Farnsteiner, K. Lendrich, J. Zink u. P. Buttenberg, Honig. IV. Bericht des Hygien. Instituts Hamburg 1900, S. 70; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1904, **7**, 310.

30. Frank, Th. Schutt und A. T. Charron, Über die Bestimmung des Wassergehaltes im Honig. Chem. News. 1903, **87**, 195 u. 210; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1904, **7**, 310.

31. E. Carpiaux, Analyse eines Kongo-Honigs. Bull. Assoc. Belg. Chim. 1903, **17**, 32; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1904, **7**, 311.

32. Albert E. Leach, Die Bestimmung von Handelsglykose in Melasse, Sirup und Honig. Journ. Amer. Chem. Soc. 1903, **25**, 982; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1904, **7**, 705.

33. Axenfeld, Invertin im Honig und im Insektendarm. Zentralbl. Physiol. 1903, **17**, 268; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1904, **8**, 518.

34. G. Marpmann, Beiträge zur Prüfung und Beurteilung des Bienenhonigs. Pharmaz. Ztg. 1903, **48**, 1010; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1904, **8**, 518.

35. H. Ley, Ein Beitrag zur Honigfälschungsfrage. Pharmaz. Ztg. 1903, **48**, 603; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1904, **8**, 519.

36. H. Matthes u. F. Müller, Bericht des Nahrungsmitteluntersuchungsamtes Jena 1903/04, S. 37.

37. H. Lührig, Kunsthonig. Bericht des chem. Untersuchungsamtes Chemnitz 1904, S. 27; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1905, **9**, 741.

38. H. Stadlinger, Die Untersuchung des Bienenhonigs. Pharmaz. Ztg. 1905, **50**, 536 und 549.

39. A. Beythien, Neuere Honigsurrogate. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1905, **10**, 14.

40. v. Raumer, Die Verwendung der Gärmethoden im Laboratorium, ein Beitrag zur Kenntnis des Stärkesirups. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1905, **9**, 705.

41. W. Kühn, Giftiger Honig. Pharmaz. Ztg. 1905, **50**, 642; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1906, **12**, 566.

42. G. Rieß, Chemische Untersuchung eines unter dem Namen Fruktin (Honigersatz) im Handel befindlichen Präparates. Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte 1905, **22**, 666; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1906, **12**, 566.

43. P. Lehmann und H. Stadlinger, Polarimetrische Bestimmung der Zuckerarten im Honig. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1907, **13**, 397.

44. P. van der Wielen, Honig und Wachs von St. Eustatius und einiges über die Bienen, welche Honig und Wachs liefern. Pharm. Weekblad 1905, **42**, 409; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1907, **13**, 757.

45. A. Reinsch, Jahresbericht Altona 1906, S. 22; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1907, **13**, 757.

46. J. Fiehe, Über die polarimetrische Bestimmung der Zuckerarten im Honig. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1907, **14**, 299.

47. P. Lehmann und H. Stadlinger, Zur Kritik der Honigprüfungsmethode von Oskar Haenle 1907, **14**, 643.

48. v. Raumer, Vorschläge des Ausschusses zur Abänderung des Abschnittes „Honig" der „Vereinbarungen". Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1907, **14**, 17.

49. K. Farnsteiner, Der Ameisensäuregehalt des Honigs. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußmittel 1908, **15**, 598.

50. F. Schaffer, Beitrag zur Honiganalyse. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1908, **15**, 604.

51. F. Schwarz, Welchen Wert hat die Bestimmung des Aschengehaltes und die Ausführung der Leyschen Reaktion bei der Honiguntersuchung? Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1908, **15**, 403 u. 739.

52. Utz, Welchen Wert hat die Bestimmung des Aschengehaltes und die Ausführung der Leyschen Reaktion bei der Honiguntersuchung? Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1908, **15**, 607.

53. Derselbe, Über die Leysche Reaktion zur Unterscheidung zwischen Naturhonig und Kunsthonig. Zeitschr. angew. Chem. 1907, **20**, 993; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1908, **15**, 360.

54. Derselbe, Über den Gehalt des Honigs an Mineralstoffen. Zeitschr. angew. Chem. 1907, **20**, 2222; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1908, **15**, 361.

55. H. Kreis, Honigtau. Bericht des kantonalen chemischen Laboratoriums Basel Stadt, 1906, S. 21; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1908, **15**, 361.

56. A. Reinsch, Jahresbericht Altona 1907, S. 25; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1908, **15**, 493.

57. J. Fiehe, Eine Reaktion zur Erkennung und Unterscheidung von Kunsthonig und Naturhonig. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1908, **16**, 75.

58. Th. Merl, Zum Nachweis der Ameisensäure im Bienenhonig. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1908, **16**, 385.

59. v. Raumer, Über die Fiehesche Reaktion zur Erkennung und Unterscheidung von Kunsthonig und Naturhonig. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1908, **16**, 517.

60. H. Barschall, Über das Molekulargewicht des im Coniferenhonig vorkommenden Dextrins. Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte 1908, **28**, 405; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1908, **16**, 414.

61. A. Röhrich, Aschengehalt des Honigs. Jahresbericht Leipzig 1907, S. 40; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1908, **16**, 415.

62. H. Kreis, Aschengehalt des Honigs. Bericht des kantonalen Laboratoriums Basel Stadt 1907, S. 27; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1908, **16**, 415.

63. A. Röhrich, Honigaroma und Honigpräparate. Jahresbericht Leipzig 1907, S. 41; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1908, **16**, 415.

64. W. Bremer und F. Sponnagel, Über die Fiehesche Reaktion zur Unterscheidung von Kunsthonig und Naturhonig unter gleichzeitiger Berücksichtigung der Reaktionen von Ley und Jägerschmid. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **17**, 664.

65. A. Jägerschmid, Beiträge zur Kenntnis der Kunsthonige. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **17**, 113.

66. Derselbe, Weitere Beiträge zur Kenntnis von Kunsthonigen. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **17**, 671.

67. M. Klassert, Kritische Betrachtungen über die Fiehesche Reaktion. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **17**, 126.

68. R. Lund, Albuminate im Naturhonig und Kunsthonig. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **17**, 128.

69. v. Raumer, Zur Beurteilung der Fieheschen Reaktion. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **17**, 115.

70. Neubauer, Über die Beurteilung des durch Zuckerfütterung der Bienen erzeugten Produktes. Rheinische Bienenzeitung 1908, **59**, 110; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **17**, 58.

71. M. Koebner, Über die Leysche Honigprobe. Chemiker-Ztg. 1908, **32**, 89; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **17**, 58.

72. H. Lührig und A. Sartori, Honig. Jahresber. Breslau 1907/08, S. 43; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **17**, 59.

73. C. A. Browne, Chemische Analyse und Zusammensetzung amerikanischer Honige. Zeitschr. d. Ver. Deutsch. Zuckerind. 1908, **45**, 751; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **17**, 469.

74. W. J. Young, Mikroskopische Untersuchung der Honigpollen. Zeitschr. d. Ver. Deutsch. Zuckerind. 1908, **45**, 806; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **17**, 471.

75. P. Soltsien, Zur Prüfung des Honigs. Pharm. Ztg. 1907, **52**, 1071; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **17**, 471.

76. Drawe, Beitrag zur Dr. Fieheschen Reaktion auf Invertzucker im Honig. Zeitschr. öffentl. Chem. 1908, **14**, 352; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **17**, 472.

77. Utz, Verkauf von Zuckerfütterungshonig als Schleuderhonig ist nicht strafbar. Zeitschr. öffentl. Chem. 1908, **14**, 171; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **17**, 472.

78. J. Fiehe, Über Erkennung und Unterscheidung von Kunsthonig und Naturhonig und Ermittelung von Rohrzucker und seinen Zersetzungsprodukten. Chemiker-Ztg. 1908, **32**, 1045; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **17**, 646.

79. Riechen und Fiehe, Die Resorzin-Salzsäurereaktion und ihr Wert bei der Honiganalyse. Chemik.-Ztg. 1908, **32**, 1090; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **17**, 646.

80. A. Reinsch, Die Fiehesche Reaktion auf Kunsthonig. Jahresbericht Altona 1908, S. 25; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **17**, 646.

81. Utz, Über die Marpmannsche Reaktion zur Unterscheidung von Schleuderhonig und von Honig, der durch Erhitzen gewonnen wurde. Zeitschr. f. öffentl. Chem. 1908, **14**, 21; Zeitschr f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **17**, 646.

82. Derselbe, Über die Verwendung des Refraktometers zur Bestimmung der Trockensubstanz und des spezifischen Gewichtes des Honigs. Zeitschr. f. angew. Chem. 1908, **21**, 1319; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **17**, 647.

83. G. Kabrhel, Einige Bemerkungen über die unter dem Namen Honigbutter in Verkehr gesetzten Produkte. Archiv f. Chem. u. Mikroskopie 1908, **1**, 177; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **18**, 482.

84. A. Röhrig, Aschengehalt des Honigs. Jahresber. Leipzig 1908, S. 34; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **18**, 482.

85. G. Benz, Die Fiehesche Reaktion bei Honiguntersuchungen. Jahresber. Heilbronn 1908, S. 19; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **18**, 482.

86. H. Kreis, Über die Leysche und Fiehesche Reaktion bei Honig. Bericht des kantonalen Laboratoriums Basel Stadt 1908, S. 24; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **18**, 482.

87. G. Neuhoff, Die Leysche und Fiehesche Reaktion. Jahresbericht Dortmund 1908, S. 11; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **18**, 332.

88. A. Behre, Die Fiehesche Reaktion. Pharmaz. Zentralhalle 1909, **50**, 175; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **18**, 332.

89. K. Keiser, Beiträge zur Chemie des Honigs mit besonderer Berücksichtigung seiner Unterscheidung von Kunsterzeugnissen. Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte 1909, **30**, 637; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **18**, 331.

90. Utz, Über Fiehes Reaktion zur Erkennung und Unterscheidung von Kunsthonigen und Naturhonigen. Zeitschr. f. angew. Chem. 1908, **21**, 2315; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **18**, 331.

91. Witte, Honiguntersuchungen. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **18**, 625.

92. J. Fiehe, Über den Nachweis von Stärkesirup im Honig und Fruchtsäften. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1909, **18**, 30. Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte 1909, **32**, 218.

93. Utz, Über die Beurteilung von Zuckerfütterungshonig. Archiv f. Chemie u. Mikroskopie 1908, **1**, 187; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **19**, 349.

94. G. Ambühl, Kunsthonigessenz. Jahresbericht des Kantonchemikers von St. Gallen 1908, S. 23; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **19**, 349.

95. H. Lührig und A. Sartori, Nachweis von Stärkesirup im Honig. Jahresbericht Breslau 1908/09, S. 38; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **19**, 349.

96. A. Reinsch, Honigprüfung nach Fiehe. Jahresber. Altona 1909, S. 25; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **19**, 348.

97. E. Baier, Honigprüfung nach Fiehe. Jahresbericht des Nahrungsmitteluntersuchungsamtes der Landwirtschaftskammer für die Provinz Brandenburg 1908, S. 22; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **19**, 348.

98. W. Alberda van Ekenstein und J. J. Blanksma, Über das β-Oxy-δ-Methylfurfurol als die Ursache einiger Farbenreaktionen der Hexosen. Chem. Weekblad 1909, **6**, 217; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **19**, 346.

99. E. Baier, Einfluß der Winterfütterung mit Rübenzucker auf die Beschaffenheit des Honigs. Jahresber. d. Nahrungsmitteluntersuchungsamtes d. Landwirtschaftskammer f. d. Provinz Brandenburg 1908, S. 22; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **19**, 346.

100. C. Reese, G. Ritzmann und F. Isernhagen, Über schleswig-holsteinische Honige. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **19**, 625.

101. A. Auzinger, Über Fermente im Honig und den Wert ihres Nachweises für die Honigbeurteilung. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **19**, 65 u. 353.

102. C. Reese, Kunsthonig. Jahresber. Kiel 1909, S. 12; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **20**, 597.

103. W. Petri, Honiguntersuchungen. Jahresbericht Coblenz 1909. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **20**, 597.

104. A. Behre, Honiguntersuchungen. Jahresbericht Chemnitz 1909, S. 40: Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **20**, 597.

105. A. Röhrig, Honiguntersuchungen. Jahresbericht Leipzig 1909, S. 32; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **20**, 597.

106. J. Hertkorn, Beiträge zur Prüfung des Honigs. Chemiker Ztg. 1909, **33**, 481; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **20**, 597.

107. J. Langer, Beurteilung des Bienenhonigs und seiner Verfälschungen mittels biologischer Eiweißdifferenzierung. Archiv Hygiene 1909, **71**, 308; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **20**, 596.

108. E. Paschen, Verfahren zur Herstellung von Kunsthonig. Patentbl. 1910, **31**, 110; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **20**, 45.

109. F. W. Dafert und Franz Freyer, Über Denaturierung des Zuckers, der zur Notfütterung der Bienen dient. Archiv f. Chem. u. Mikroskopie 1909, **2**, 15; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **20**, 45.

110. F. Utz, Über den Säuregehalt des Bienenhonigs. Pharm. Post 1908, **41**, 69 u. 81; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **20**, 44.

111. K. Braungad, Über Honig. Pharm. Ztg. 1909, **54**, 16; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **20**, 44.

112. F. Reinhardt, Beiträge zur Untersuchung des Honigs, insbesondere über die Reaktionen von Ley, Fiehe und Jägerschmid. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **20**, 113.

113. E. v. Raumer, Zur Fieheschen Reaktion. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **20**, 583.

114. Th. Nußbaumer, Beitrag zur Kenntnis der Honiggärung nebst Notizen über die chemische Zusammensetzung des Honigs. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **20**, 272.

115. C. Amberger, Das Wesen der Leyschen Reaktion. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1910, **20**, 665.

116. H. Quantin, Invertzucker in den Handelshonigen. Ann. chim. analyt. 1910, S. 299.

117. G. Curtel, Die Honiganalyse. Annal. des Falsif. 1910, **3**, 497.

118. F. Muttelet, Der Honig und seine Untersuchung. Annal. des Falsif. 1910, **3**, 503.

119. F. Moreau, Untersuchung französischer Honige. Annal. des Falsif. 1910, **3**, 513.

120. Lindner, Beitrag zur Honiganalyse. Pharmaz. Zentralhalle 1910, **51**, 103; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **21**, 627.

121. H. Lührig, Über Honigbeurteilung. Pharm. Zentralhalle 1909, **50**, 605; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **21**, 627.

122. Derselbe, Über Honigbeurteilung. Pharm. Zentralhalle 1909, **50**, 355; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **21**, 626.

123. M. Nyman und A. Wichmann, Über die Resorzinprobe bei der Honiguntersuchung. Pharm. Zentralhalle 1910, **51**, 815; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **21**, 301.

124. R. Lund, Über die Untersuchung des Bienenhonigs unter spezieller Berücksichtigung der stickstoffhaltigen Bestandteile. Mitteil. aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, veröff. vom Schweizer Ges.-Amt 1910, **1**, 38; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **21**, 300.

125. Schweizerische Honigstatistik. Die Honige des Jahres 1909. Schweizer Bienenzeitung 1910, Nr. 7; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **21**, 121.

126. W. Hartmann, Die Anwendung der Fieheschen Reaktion. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **21**, 374.

127. A. Heiduschka und Kaufmann, Über die flüchtigen Säuren im Honig. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **21**, 375.

128. H. Lührig und A. Scholz, Beiträge zur Beurteilung des Honigs auf Grund der Fieheschen Reaktion. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genußm. 1911, **21**, 721.

129. F. Riechen, Beiträge zur Fieheschen Reaktion. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **21**, 216.

130. H. Witte, Honiguntersuchungen. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **21**, 305.

131. F. Muttelet, Die Begriffsbestimmung, die Verfälschung und die Analyse des Honigs. Moniteur Scientifique 1911, S. 145.

132. E. Moreau, Identifizierung und Bestimmung der Stickstoffsubstanzen des Honigs. Annal. des Falsif. 1911, **4**, 36.

133. Derselbe, Biologische Studien über Honig. Annal. des Falsif. 1911, **4**, 65.

134. Derselbe, Biologische Untersuchung des Honigs. Annal. des. Falsif. 1911, **4**, 145.

135. G. Armani u. J. Barboni, Beitrag zur Analyse des Honigs. Rendiconti della Soc. Chim. Ital., Mars 1911, S. 23; Chemiker Ztg. 1911, **35**, 383.

136. Küstenmacher, Über die Chemie der Honigbildung. Biochemische Zeitschr. 1911, **40**, 237.

137. Verda, Neuere Methoden der Honiganalyse. Chemiker Ztg. 1911, **35**, 1112.

138. Gottfried, Der Mangangehalt der Honige. Pharmaz. Zentralhalle 1911, **52**, 787.

139. Kappeller und Gottfried, Honiguntersuchungen. Jahresbericht Magdeburg 1910, S. 20; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **22**, 372.

140. v. Roehl, Leysche Reaktion des Honigs. Jahresber. Pforzheim 1910, S. 2; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **22**, 372.

141. L. van Giersbergen, Über Honig und Honigbeurteilungen. Chem. Weekbl. 1910, **7**, 629; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **22**, 372.

142. W. Lenz, Ein neues peptisches Enzym aus Honig. Apotheker-Zeitung 1910, **72**, 678.

143. Heiduschka, Über Säuren im Honig. Pharmaz. Zentralhalle 1911, **52**, 1051.

144. G. L. Voermann, Chemische Beurteilung von Honig. Chemisch Weekbl. 1910, **7**, 638; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **22**, 371.

145. N. Fabris, Über die Bestimmung des Wassers im Honig. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **22**, 353.

146. E. Feder, Ein Vorschlag zur Prüfung des Honigs auf künstlichen Invertzucker. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **22**, 411.

147. K. Fehlmann, Beiträge zur mikroskopischen Untersuchung des Honigs mit spezieller Berücksichtigung des Schweizerhonigs und der in die Schweiz eingeführten fremden Honige. Mitteil. auf dem Gebiete der Lebensmittel-Unters. u. Hygiene, veröff. vom Schweizer Ges.-Amt 1911, **2**, 179 und 220; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **22**, 671.

148. Th. von Fellenberg, Viskositätsbestimmungen im Honig; Mitteilungen auf dem Gebiete der Lebensmittel-Unters. u. Hygiene, veröff. vom Schweizer Ges.-Amt 1911, **2**, 161; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **22**, 670.

149. J. Thöni, Die Verwendung der quantitativen Präzipitinreaktion bei Honiguntersuchungen. I. Mitteilung. Mitteilungen auf dem Gebiete der Lebensmittel-Unters. u. Hygiene, veröff. vom Schweizer Ges.-Amt 1911, **2**, 80; Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **22**, 669.

150. L. Rosenthaler, Über Mutarotation des Honigs. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **22**, 644.

151. K. Lendrich und F. Nottbohm, Beitrag zur Kenntnis ausländischer Honige. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1911, **22**, 634.

152. J. Thöni, Die Verwendung der quantitativen Präzipitinreaktion bei Honiguntersuchungen. II. Mitteilung. Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, veröff. vom Schweiz. Gesundheitsamt 1912, **3**, 74.

153. A. Hugh Bryan, Chemische Analyse und Zusammensetzung von Auslandshonig aus Cuba, Mexiko und Haiti. U. S. Department of Agriculture, Bureau of Chemistry, Bulletin Nr. 154. 1912.

154. D. L. van Dine und Alice R. Thompson, Hawaiische Honige. Hawaii Agricultural Experiment Station. Bulletin Nr. 17. 1908.

155. G. L. Voerman und C. Bakker, Untersuchung einiger Proben echter Honige. Chemisch Weekblad 1911, 8, 784.

156. G. Halphen, Das Studium der Reaktion nach Fiehe. Annal. des Falsif. 1912, **5**, 105.

157. L. Stoecklin, Die Reaktion nach Fiehe bei der Honiganalyse. Annal. des Falsif. 1912, **5**, 118.

Ende des 3. Heftes.

Abgeschlossen am 25. Juni 1912.

L 410 m. 422
428

Vergleichende Untersuchungen über verschiedene Choleraelektivnährböden.

Von

Professor **Dr. Haendel,**
Regierungsrat im Kaiserlichen Gesundheitsamte,

und

Oberarzt **Dr. Baerthlein,**
kommandiert zum Kaiserlichen Gesundheitsamte.

Nachdem es Dieudonné (1) gelungen war, einen Choleraelektivnährboden herzustellen, sind in kurzer Zeit von verschiedenen Autoren mehrere, ebenfalls das Wachstum der Cholerakeime elektiv begünstigende Nährböden angegeben worden, die zum großen Teil Modifikationen des ursprünglichen Dieudonnéschen Blutalkaliagars darstellen. Im Hinblick auf die große Bedeutung, welche diesen Nährböden für die bakteriologische Choleradiagnose zukommt, sind in dem bakteriologischen Laboratorium des Kaiserlichen Gesundheitsamts seit längerer Zeit umfangreiche, vergleichende Untersuchungen über die Leistungsfähigkeit dieser verschiedenen Nährsubstrate ausgeführt worden, deren Ergebnisse nachstehend unter ausführlicher Wiedergabe der Versuchsprotokolle mitgeteilt werden sollen. Zu den vergleichenden Untersuchungen waren herangezogen:

1. Der Dieudonnésche Nährboden
2. Die von Neufeld und Woithe (2) } angegebenen
3. Die von Esch (3) . . . . . } Modifikationen.
4. Die von Pilon (4) . . . . . }
5. Getrockneter Dieudonnéscher Blutalkaliagar.

Außerdem wurde bei den Versuchen zugleich eine vergleichende Prüfung des von Ottolenghi (5) angegebenen Galleanreicherungsverfahren für Cholera gegenüber der bisher geübten Peptonwasseranreicherung durchgeführt.

Auf die früheren Versuche, welche verschiedene Autoren schon vor Dieudonné mit alkalischen Nährböden bei Cholera angestellt hatten, soll hier nicht näher eingegangen werden. Wir verweisen in dieser Hinsicht auf die Arbeit von Neufeld und Woithe. Erwähnt sei hier nur, daß in der vorangegangenen Zeit von Heim (6) bereits die Verwendung von Blutnährböden für die Cholerazüchtung empfohlen worden war.

I. Zusammensetzung der Nährböden. Dieudonnéscher Blutalkaliagar.

Dieudonné hatte die Erfahrung, daß der Choleravibrio auch bei stark alkalischer Reaktion des Nährbodens gut gedeiht[1]) und in seinem Wachstum durch Zusatz von Rinderblut zu dem Nährsubstrate gefördert wird, für die Herstellung eines Elektivnährbodens für Cholera verwertet.

Nach der ursprünglichen Angabe Dieudonnés geschieht die Bereitung des Nährbodens in der Weise, daß defibriniertes Rinderblut zu gleichen Teilen mit Normalkalilauge gemischt, und die lackfarbene Blutalkalilösung eine halbe Stunde im Dampftopf sterilisiert wird. Der Mischung wird 3 %iger, genau auf den Neutralpunkt eingestellter Agar im Verhältnis von 3:7 zugegeben, und die Nährlösung darauf in Platten ausgegossen.

Neufeld und Woithe empfehlen, die Platten etwas dicker zu gießen, als es sonst üblich ist, und etwa 15 ccm des Nährbodens für eine Petrischale von 10 ccm Durchmesser zu verwenden. Sie lassen die Schalen dann $^1/_4$ Stunde an einem staubgeschützten Ort halboffen abdampfen. Wenn die Nährbodenschicht fest geworden ist, werden die Schalen geschlossen und mit dem Deckel nach unten je nach dem Feuchtigkeitsgehalt bis zu 15 Stunden im Brutschrank bei 37° gehalten. Es werden dabei zweckmäßig zwischen Ober- und Unterschale und ihre Wandungen kleine Streifen Fließpapier eingeklemmt, wodurch die Schalen in geringem Grade offen gehalten werden, und ein Aufsaugen und Entweichen der Feuchtigkeit und der Abdampfstoffe erreicht wird. Dieses Vorgehen hat sich auch bei unseren Versuchen besonders gut bewährt.

Auf diesem Nährboden gedeihen Choleravibrionen sehr üppig, während andere Keime, darunter auch die gewöhnlichen Stuhlbakterien, insbesondere auch das Bakterium Coli überhaupt nicht oder nur sehr spärlich zur Entwicklung gelangen.

Der neue Nährboden ist in dem Institut für Infektionskrankheiten von Huntemüller (7) und in dem Gesundheitsamte von Neufeld und Woithe (8), sowie an verschiedenen anderen Stellen von zahlreichen Autoren in Laboratoriumsversuchen und in der Praxis eingehenden Nachprüfungen unterzogen worden, die übereinstimmend günstig ausfielen. Es ergab sich zwar, daß auf dem Nährboden auch andere Vibrionen, sowie einzelne Bakterienarten zum Wachstum kommen können, daß aber bei diesen Untersuchungen die Entwicklung der Choleravibrionen doch so vorherrschend war, daß man in der Tat diesen Agar als elektiv für Cholera bezeichnen konnte. Auch in der Praxis hat sich der Nährboden bereits sehr gut bewährt. Der eine Nachteil haftet allerdings dem Nährboden an, daß er nicht sofort, sondern erst einige Zeit, im ungünstigen Falle eventuell erst 18 Stunden nach dem Ausgießen der Platten verwendungsfähig ist. Bei sofortiger Benutzung kann jedes Bakterienwachstum, auch die Entwicklung der Cholerabakterien unterdrückt werden, weil sich, wie ursprünglich von Huntemüller angenommen wurde, aus den frisch gegossenen Platten zunächst noch beträchtliche Mengen von Ammoniak entwickeln und dadurch innerhalb der ersten 24 Stunden auch die Choleravibrionen in ihrem Wachstum gehemmt und geschädigt werden sollten. Bei der Besprechung des Nährbodens nach Pilon kommen wir auf die andere von diesem Autor hierfür gegebene Erklärung noch zurück.

---

[1]) In der amtlichen Anleitung für die bakteriologische Feststellung der Cholera ist aus diesem Grunde ein Agar empfohlen, dem nach Herstellung des Lackmusneutralpunktes auf 1 30 ccm einer 10%igen Lösung von kristallisiertem, kohlensaurem Natrium zugesetzt sind.

Die von Neufeld und Woithe angegebene Modifikation.

Um den vorstehend erwähnten Nachteil des Dieudonnéschen Orginalblutalkaliagars zu beseitigen, haben Neufeld und Woithe empfohlen, unmittelbar vor dem Ausgießen zu Platten auf 100 ccm des Nährbodens 2 ccm 10 % Milchsäure behufs Bindung des Ammoniaks, bezw. zur Neutralisation eines etwaigen Überschusses der nach dem langen Kochen etwa noch überschüssigen Lauge hinzuzusetzen. Bei diesem Vorgehen ist der Nährboden nach ¼stündigem Trocknen der Platten im Brutschrank bei 60° sofort brauchbar. Er behält aber seine Elektivität für Cholera nur verhältnismäßig kurze Zeit, weil nach 24—48 Stunden die Alkaleszenz des Nährbodens bereits infolge der durch den Säurezusatz bedingten, fortschreitenden Neutralisation stark herabgemindert wird.

Die von Esch angegebene Modifikation.

Einen ebenfalls sofort brauchbaren Nährboden erzielte Esch dadurch, daß er 5 g käufliches Hämoglobin (von der Firma Merck Darmstadt) in 15 ccm Normalnatronlauge + 15 ccm Aqua destillata löste, diese Lösung eine Stunde in Dampf sterilisierte und davon dann 15 ccm mit 85 ccm Neutralagar gut mischte. Die gegossenen Platten sind nach kurzer Trocknung im Brutschrank bei 60° sofort verwendbar. Esch gibt allerdings selbst an, daß sein Hämoglobinnatronagar das Wachstum anderer Bakterien nicht in demselben Maße zurückhält, wie der Dieudonnésche Blutalkaliagar. Eine Prüfung der Leistungsfähigkeit dieser von Esch empfohlenen Modifikation in dem Hygienischen Institut der Universität Berlin durch Friedrichs (9) hat zu günstigen Ergebnissen geführt.

Die von Pilon angegebene Modifikation.

Nach Pilon beruht der Nachteil der späten Verwendbarkeit des Dieudonnéschen Blutalkaliagars nicht auf der Ammoniakentwicklung, sondern darauf, daß der ursprünglich hohe Kalilaugengehalt des Nährbodens für das Wachstum auch der Cholerakeime schädlich ist. Erst wenn die Kalilauge durch die Kohlensäure der Luft in Karbonat umgewandelt ist, ist der Nährboden verwendbar. Wie Pilon zeigte, läßt sich dieser Prozeß dadurch beschleunigen, daß man die Kalilauge-Blutplatten einige Zeit in Kohlensäureatmosphäre hält. Entsprechend diesen Feststellungen gewinnt Pilon nun auch einen sofort gebrauchsfähigen Nährboden, wenn er überhaupt an Stelle der Kalilauge Sodalösung benutzt. Er verfuhr dabei in der Weise, daß er defibriniertes Blut — er empfiehlt besonders Schweineblut — mit 12 % Sodalösung zu gleichen Teilen mischte und die Blutsodamischung neutralem 4 %igem Agar im Verhältnis 3:7 zusetzte. Die mit diesem Nährboden gegossenen Platten sind nach der Abkühlung und ¼stündiger Trocknung bei 60° gebrauchsfähig.

Getrockneter Dieudonnéscher Blutalkaliagar.

Dieser Nährboden war uns von den Herren Oberstabsarzt Professor Dr. Hoffmann und Stabsarzt Dr. Kutscher in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt worden. Seine Herstellung geschieht in der Weise, daß Dieudonnéscher Original-

agar in Schalen ausgegossen und im Faust-Heimschen Apparat getrocknet wird. Der Nährboden bildet dann ein braunes, ziemlich grobkörniges Pulver, das, vor Feuchtigkeit geschützt aufbewahrt, lange Zeit haltbar ist. Zur gebrauchsfertigen Herstellung werden 8 g dieses Pulvers in 100 ccm Wasser gelöst und die Lösung $^1/_2$ Stunde im Dampftopf gekocht. Läßt man nach dem Aufkochen den Nährboden einige Zeit im Kolben stehen und sich absetzen, so wird er ziemlich hell und durchscheinend. Er kann dann sofort in Platten ausgegossen und nach kurzer Trocknung bei 60° benutzt werden.

Galleanreicherung nach Ottolenghi.

Nach den Angaben Ottolenghis wird frische Ochsengalle durch Papierfilter filtriert und dem Filtrat 3 ccm einer 10 %igen Lösung von kristallisiertem Natriumkarbonat sowie 0,1 % Kaliumnitrat beigemengt. Die Reagensröhrchen werden mit je 5 ccm dieses Gemisches beschickt und dann sterilisiert. Als Vorteile dieses Nährsubstrates gegenüber dem Peptonwasser gibt Ottolenghi an, daß sich in ihm die reichlich in den Faeces vorhandenen Coli-Keime und auch andere Keime, welche zuweilen in den Faeces vorkommen, entweder überhaupt nicht oder so spärlich entwickeln, daß die Isolierung der Choleravibrionen aus den aus den Faeces angelegten Kulturen in der Galle sehr leicht ist. Ferner liefere die Galleanreicherung auch gute Resultate, wenn nur spärliche Choleravibrionen in den Faeces enthalten sind. Die Isolierung der Choleravibrionen gelinge sehr rasch, und endlich könne man bei der schwachen Entwicklung anderer Mikroorganismen ziemlich große Mengen von Faeces in die Galle einsäen.

Für die von uns durchgeführten vergleichenden Untersuchungen erfolgte die Herstellung der Nährböden zunächst jeweils genau nach den von den Autoren ursprünglich angegebenen, vorstehend erwähnten Vorschriften.

Die Bereitung der verschiedenen geprüften, festen Nährböden ist bei allen ziemlich gleich einfach, sodaß sich in dieser Hinsicht bei ihnen, wie hier gleich bemerkt sei, ein wesentlicher Unterschied nicht geltend macht. Ein gewisser Vorteil des Eschschen Nährbodens liegt allerdings darin, daß das dazu erforderliche Hämoglobin gut haltbar ist und stets zur Herstellung des Nährbodens vorrätig gehalten werden kann.

In ihrem Aussehen unterscheiden sich die geprüften Nährböden bei der gewöhnlichen Herstellung insofern untereinander, als die Platten des Dieudonnéschen Originalagars, der Neufeld-Woitheschen und der Pilonschen Modifikation ziemlich gleichmäßig eine braune Farbe zeigen und nur wenig durchscheinen, während die aus getrocknetem Blutalkaliagar hergestellten Platten wie die des Hämoglobinnatronagars von Esch heller und etwas durchsichtiger sind. Die Herkunft des für die Nährböden verwendeten Blutes war ohne wesentlichen Einfluß auf das Aussehen derselben. Ebenso zeigte sich bei Verwendung verschiedener Blutarten (vom Rind, Schwein, Pferd, Hammel, Ziege und Kaninchen) kein besonderer Unterschied bezüglich der Leistungsfähigkeit der einzelnen Nährböden, nur bei der Neufeld-Woitheschen Modifikation scheint in einzelnen seltenen Fällen doch die Beschaffenheit des verwendeten Blutes auf die Brauchbarkeit des Nährbodens von Einfluß zu sein. Wir kommen noch

darauf zurück. Eine wesentliche Aufhellung des Nährbodens erzielten wir dadurch, daß wir älteres, defibriniertes Blut verwendeten, welches bereits einige Zeit im Eisschrank aufbewahrt war. Die Platten zeigten bei Benutzung solchen Blutes ein agarähnliches Aussehen und waren vollkommen hell und durchscheinend, hatten aber ihre Elektivität für Cholera unverändert bewahrt. Die fertig gegossenen Platten blieben, im Eisschrank aufbewahrt, bei allen Nährböden etwa 14 Tage gebrauchsfähig, nur die Blutalkaliagarplatten mit Milchsäurezusatz verloren, wie bereits erwähnt, bald ihre Elektivität. Bei allen Nährböden wurden aber die Platten schon nach etwa 8tägiger Aufbewahrung im Eisschrank recht weich, so daß bei diesen die spätere Beimpfung nur unter besonderer Vorsicht ausgeführt werden konnte. Eine längere Aufbewahrung der Nährböden im fertigen Zustande in Kolben empfiehlt sich nicht, die Nährböden leiden durch das erforderliche wiederholte Kochen stark, werden weich, brüchig und bald völlig unbrauchbar.

Die vergleichende Prüfung der einzelnen Nährböden wurde in verschiedenen Versuchsreihen durchgeführt.

I.

In der ersten Versuchsreihe wurde das Wachstum einer größeren Zahl von Cholerareinkulturen und von Kulturen choleraähnlicher Vibrionen auf den einzelnen Nährböden geprüft. Die zu den Untersuchungen herangezogenen Kulturen von Cholera und choleraähnlichen Vibrionen sind in den Tabellen I und II (S. 362) zusammengestellt.

Die Versuchsreihe sollte einmal darüber Aufschluß geben, ob sich bei Benutzung zahlreicher, verschiedener Cholerakulturen vielleicht bei einigen derselben ein Unterschied im Wachstum auf den einzelnen Nährböden zeigen würde, und ob die zu den Versuchen herangezogenen choleraähnlichen Kulturen gleichmäßig auf allen Nährböden zur Entwicklung kommen würden. Schließlich sollte durch die Heranziehung einer größeren Zahl von Cholerakulturen die Frage geklärt werden, ob nicht doch vielleicht bei der einen oder anderen Kultur die Agglutinationsfähigkeit durch das Wachstum auf den Elektivnährböden beeinträchtigt würde.

Der Prüfung einer größeren Anzahl von Cholerakulturen auf ihre Agglutinationsfähigkeit nach dem Wachstum auf den Elektivnährböden war aus dem Grunde besondere Aufmerksamkeit zu schenken, weil Laubenheimer (8) angegeben hatte, daß die Agglutinationsfähigkeit der Cholerakulturen durch das Wachstum auf dem Dieudonné-Agar beeinträchtigt werden würde. Von Dieudonné selbst wie von anderen Untersuchern waren zwar derartige Beobachtungen nicht gemacht worden, bei der Wichtigkeit, welche dieser Frage für die Beurteilung des Wertes der Elektivnährböden zukommt, erschienen aber eingehende Untersuchungen hierüber bei den Vergleichsversuchen doch notwendig.

Was nun zunächst die Entwicklung der Cholerakulturen auf den erwähnten Nährböden anbelangt, so ergab sich, daß von 21 zu diesen Versuchen benutzten, in Tabelle I aufgeführten älteren und jüngeren Laboratoriums-Cholera-Stämmen alle auf dem Dieudonnéschen Originalagar, auf dem in getrockneter Form aufbewahrten

Tabelle I.

Nr.	Cholerastämme	Nr.	Cholerastämme
1	Chol. 74 vir	12	Chol. Ruhleben
2	„ Ch.	13	„ El. Tor 1
3	„ 3 vir	14	„ „ „ 5
4	„ Ostpreußen	15	„ „ „ 1906
5	„ Kulm	16	„ Freiburg
6	„ Baku	17	„ Sarn. I
7	„ 818	18	„ „ II
8	„ 819	19	„ „ III
9	„ Rußland 1	20	„ Heubeck
10	„ „ 2	21	„ Behrens
11	„ „ 3		

Tabelle II.

Nr.	Bezeichnung der Kultur	Herkunft
1	Vibrio Petersburg 0	aus Wasser gezüchtet
2	„ „ 5	„
3	„ „ 6	„
4	„ „ 7	„
5	„ 896 Elbe	„
6	„ 788 „	„
7	„ 956 „	„
8	„ 818 „	„
9	„ 819 „	„
10	„ Kind	aus menschlichem Stuhl isoliert
11	„ Krüger	„
12	„ Cimann	„
13	„ Schmöck	aus menschlichem Blut gezüchtet
14	„ Elwers	aus Wasser gezüchtet
15	„ Metschnikoff	—

Dieudonnéschen Blutalkaliagar und auf dem Hämaglobinnatronagar gleichmäßig reichliches Wachstum zeigten, sodaß in dieser Hinsicht ein stärker ausgesprochener Unterschied zwischen diesen Nährböden bei keiner Kultur festzustellen war. Auf dem Pilonschen Blutsodaagar wuchsen sowohl die Cholerakulturen wie die Vibrionen in der Regel noch etwas üppiger.

Zur Aussaat auf den Platten war jeweils in gleicher Weise nur 1 Öse einer Kochsalzaufschwemmung von $^1/_5$ Öse Kultur in 20 ccm NaCl verwandt worden.

Auch bei dem Blutalkaliagar mit Milchsäurezusatz nach Neufeld und Woithe war das Wachstum, abgesehen von 2 Fällen, mit dem auf den ersterwähnten Nährböden übereinstimmend. In den beiden Ausnahmefällen kam auf den in Benutzung genommenen Proben dieses Nährbodens, obwohl sie genau wie sonst hergestellt waren, keine der Cholerakulturen und der Vibrionenkulturen zur Entwicklung. Eine be-

stimmte Erklärung für dieses Ergebnis vermögen wir nicht zu geben; wir neigen zu der Annahme, daß bei dieser Modifikation des Nährbodens in seltenen Fällen und anscheinend abhängig von der Beschaffenheit des gerade benutzten Blutes durch den Milchsäurezusatz die wachstumshemmende Eigenschaft des frischen Blutalkaliagars doch nicht hinreichend beeinflußt, bezw. paralysiert wird. Man wird daher bei dieser Modifikation ein Versagen des Nährbodens in vereinzelten Fällen nicht mit absoluter Sicherheit ausschließen können, und es würde sich deshalb jedenfalls empfehlen, in der Praxis bei den Stuhluntersuchungen die Wirksamkeit dieses Nährbodens in jedem Falle noch durch Beimpfung einer besonderen Kontrollplatte mit einer Cholerareinkultur zu kontrollieren.

Bezüglich der Agglutinabilität der einzelnen Kulturen ergab sich übereinstimmend für alle Nährböden, daß durch das Wachstum auf denselben eine Verringerung des Agglutinationsvermögens der Kulturen nicht stattfindet, jedenfalls nicht in dem Grade, daß dadurch eine sichere und rasche Diagnosestellung erschwert oder unmöglich gemacht würde.

Einzelne Cholerakulturen wurden von agglutinierendem Serum zwar etwas schwächer beeinflußt als Vergleichskulturen von Agarplatten, auch trat im allgemeinen die Agglutination etwas langsamer ein. Diese Unterschiede sind jedoch so gering, daß ihnen praktisch keine Bedeutung zukommt.

Da das von den Elektivnährböden für die Agglutination abgestrichene Kulturmaterial eine etwas klebrig-zähe Konsistenz hat, so ist allerdings bei der Agglutinationsprüfung darauf zu achten, daß das Material sorgfältig und gleichmäßig verrieben wird.

Auf dem Dieudonnéschen Originalagar und dem Eschschen Nährboden bilden die Cholerastämme ziemlich gleichartige Kolonien in Form von kleinen, saftig aussehenden, rauchbraun bis grünlich schimmernden, runden Scheibchen. Auf den mit älterem Blut bereiteten und durchscheinenden Platten und auf dem in getrockneter Form aufbewahrten Dieudonnéagar war das Aussehen der Kolonien mehr gräulich mit einem weißlich schimmernden Zentrum[1]). Auf dem Pilonschen Nährboden entwickelten sich die Kolonien meist zu saftigeren und größeren Scheiben als auf den anderen Elektivnährböden, sie zeigten ebenfalls ein mehr hellgraues, im Zentrum weißlich getrübtes Aussehen.

Von den choleraähnlichen Vibrionen wurden zu diesen Versuchsreihen ebenfalls verschiedene Stämme herangezogen, welche zum Teil aus menschlichem Stuhl, bezw. Blut isoliert waren. (Vergl. Tabelle II.)

Bei diesen Stämmen machten sich recht beträchtliche Unterschiede bezüglich des Wachstums auf den einzelnen Nährböden bemerkbar. Auf dem Eschschen Agar kamen alle Vibrionenstämme zur Entwicklung. Die Kolonien einzelner Vibrionenkulturen unterschieden sich allerdings von denen echter Cholera dadurch, daß sie gegenüber dem braungrünlichen Tone der letzteren ein mehr hellgraues bis

---

[1]) Auf dem in getrockneter Form aufbewahrten Dieudonnéagar war dies nur der Fall, wenn die Nährböden nach dem Aufkochen in Kolben einige Zeit zum Absetzen stehen gelassen waren.

weißlichgraues Aussehen zeigten. Die Unterschiede sind aber nicht immer so stark ausgeprägt und so durchgreifend, daß sie für eine Differenzierung der Kolonien choleraähnlicher Vibrionen und der echten Cholerakolonien in der Praxis verwertet werden könnten. Ebenso entwickelten sich auf dem Pilonschen Blutsodaagar alle Vibrionenstämme sehr gut, in der Regel noch üppiger wie auf der Eschschen Modifikation. Die Vibrionenkolonien bildeten hier ebenfalls saftige, große Scheiben von hellgrauem Aussehen mit weißlichem Zentrum und zeigten keine hervortretenden Unterschiede gegenüber den Cholerakolonien.

Auf dem Dieudonnéschen Originalagar und auf dem in getrockneter Form aufbewahrten Dieudonnéagar kamen die meisten choleraähnlichen Vibrionen dagegen spärlicher zur Entwicklung wie echte Cholera. Ihre Kolonien blieben bei gleicher Aussaat meist kleiner und waren auch weniger zahlreich. 2 Vibrionenstämme wuchsen auf diesem Nährboden überhaupt nicht. Die Neufeld-Woithesche Modifikation erwies sich den Vibrionen gegenüber in dieser Hinsicht noch stärker für Cholera elektiv, indem auf diesem Nährboden das Wachtum mehrerer Vibrionenstämme entweder ganz unterdrückt wurde oder im Vergleich zu Cholera äußerst dürftig war.

Die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe lassen sich sonach dahin zusammenfassen, daß:

1. die einzelnen Cholerastämme auf den verschiedenen geprüften Nährböden im allgemeinen ziemlich gleichmäßig zur Entwicklung kommen. Auf dem Pilonschen Blutsodaagar ist das Wachstum aller Cholerastämme noch etwas üppiger als auf den anderen Elektivnährböden.

Bei dem Blutalkaliagar mit Milchsäurezusatz ist damit zu rechnen, daß dieser Nährboden gelegentlich einmal, wenn auch wohl nur selten, trotz vorschriftsmäßiger Herstellung versagen kann. Vielleicht trägt in einem derartigen Falle eine besondere Beschaffenheit des Blutes für das Versagen des Nährbodens die Schuld.

2. Die Agglutinationsfähigkeit der Cholerakulturen wird durch das Wachstum auf den Elektivnährböden nicht wesentlich, jedenfalls nicht derart vermindert, daß dadurch die Diagnosestellung beeinträchtigt würde.

3. Choleraähnliche Vibrionenstämme kommen auf dem Eschschen und dem Pilonschen Nährboden ebensogut zur Entwicklung wie echte Cholera. Das Aussehen der Vibrionen- und Cholerakolonien ist auf den Nährböden, abgesehen von dem Pilonschen Blutsodaagar, zum Teil etwas verschieden, die Unterschiede sind aber nicht so groß und durchgreifend, daß sie praktisch verwertet werden könnten.

Auf dem Dieudonné-Originalagar ist bei den meisten Vibrionenstämmen das Wachstum spärlicher wie das echter Cholera. Einzelne Vibrionenstämme kommen auf diesem Nährboden überhaupt nicht zur Entwicklung. Noch günstiger liegen in dieser Hinsicht die Verhältnisse bei dem nach Neufeld-Woithe modifizierten Agar, da auf ihm das Wachstum noch einer größeren Zahl von Vibrionenstämmen völlig oder fast vollständig unterdrückt wird.

Nachdem somit diese Versuchsreihe gezeigt hatte, daß bezgl. der wachstums- und entwicklungsfördernden Eigenschaft für die verschiedenen Cholerastämme zwischen

dem Originalnährboden von Dieudonné und den einzelnen Modifikationen keine wesentlichen Unterschiede bestehen, sollten die weiteren Untersuchungen Aufschluß geben über die entwicklungshemmenden Eigenschaften der Nährböden anderen, insbesondere den Stuhlbakterien gegenüber.

II.

Zu diesem Zwecke wurden zunächst unter Benutzung von 109 verschiedenen Stuhlproben die Nährböden in 3 größeren Versuchsreihen bezgl. ihrer wachstumshemmenden Kraft gegenüber Stuhlbakterien vergleichend geprüft.

35 Stuhlproben wurden in einer Versuchsreihe gleichzeitig mit dem Dieudonnéschen Originalagar, der Eschschen und der Neufeld-Woitheschen Modifikation untersucht, 19 Stuhlproben wurden mit dem Originalagar und dem in trockener Form aufbewahrten Dieudonnéagar und 55 Proben mit dem Originalagar und dem Pilonschen Blutsodaagar vergleichend geprüft.

Die Stuhlproben stammten teils von Gesunden, teils von Kranken. Unter den letzteren befanden sich insbesondere Personen, welche an akuten, zum Teil fieberhaften Darmkatarrhen erkrankt oder von akuten fieberhaften Allgemeinerkrankungen befallen waren.

Die Beimpfung der Platten erfolgte gleichmäßig in der Weise, daß jeweils eine große Öse des Stuhls auf einer Platte ausgestrichen wurde.

Über den Ausfall der drei Versuchsreihen geben die nachstehenden Tabellen III, IV und V (S. 366—380) näheren Aufschluß.

Aus den in Tabelle III zusammengestellten Versuchen über das die Entwicklung der Stuhlbakterien hemmende Verhalten des Dieudonnéschen Originalagar im Vergleich zu der Modifikation nach Esch und der nach Neufeld-Woithe ist ohne weiteres ersichtlich, daß die beste entwicklungshemmende Wirkung auf Stuhlbakterien von dem Blutalkaliagar mit Milchsäurezusatz nach Neufeld und Woithe ausgeübt wird. Von den mit diesem Nährboden in der ersten Versuchsreihe (Tabelle III) untersuchten Stuhlausstrichen wurde bei 11 das Wachstum der Stuhlbakterien vollständig unterdrückt, die Platten blieben in diesen Fällen vollkommen steril. Der Dieudonnésche Originalagar steht an zweiter Stelle. Bei ihm blieben in dieser Versuchsreihe 5 Stuhlausstriche steril. Wesentlich ungünstiger sind die Ergebnisse bei der Eschschen Modifikation, indem hier in keinem Falle die Entwicklung der Stuhlbakterien vollkommen unterdrückt wurde.

Bei den in der Tabelle IV zusammengestellten Versuchen blieben von 19 Stuhlausstrichen auf dem Dieudonnéschen Originalagar 6 steril, auf den Platten des in getrockneter Form aufbewahrten Blutalkaliagars wurde nur in einem Falle das Wachstum der Stuhlbakterien vollständig unterdrückt.

In der 3. Versuchsreihe (Tabelle V) wurde auf dem Dieudonnéschen Originalagar bei 22, auf dem Pilonschen Blutsodaagar bei 2 unter 55 Stuhlproben jedes Bakterienwachstum verhindert.

Tabelle III. Untersuchung von Stuhlausstrichen.

Nummer des Stuhles	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Neufeld und Woithe modifizierten Nährboden	Wachstum auf dem nach Esch modifizierten Nährboden
Stuhl Nr. 1	1. Spärl. Wachstum von sehr feinen, zarten Kolonien, die aus Staphylokokken bestehen. 2. Vereinzelte rauchbraune, choleraähnliche Kolonien, die von kurzen, schlanken Stäbchen gebildet werden = Stamm D. 1 (Vibrionen).	Vereinzelte, sehr kleine, zarte, von Staphylokokken gebildete Kolonien.	1. Sehr zahlreiche, rasenförmig angeordnete, choleraähnliche, aruchbraune Kolonien, die aus kurzen, schlanken Stäbchen bestehen = Stamm E. 1 (Vibrionen). 2. Vereinzelte, graue, etwas größere Kolonien, aus kurzen, dicken, plumpen Stäbchen sich zusammensetzend = Stamm E. 2. 3. Reichliche Entwicklung äußerst feiner, zarter, von Staphylokokken gebildeter Kolonien.
Stuhl Nr. 2	Steril	Steril.	1. Ziemlich reichliches Wachstum von rauchbraunen, choleraähnlichen Kolonien, die aus kurzen, plumpen Stäbchen sich zusammensetzen = Stamm E. 3. 2. Zahlreiche, sehr feine, zarte Staphylokokken-Kolonien.
Stuhl Nr. 3	1. Spärl. Wachstum von zarten, hellgrauen Kolonien, die von zarten, schlanken Stäbchen gebildet werden = Stamm D. 2. 2. Spärliche zarte graubraune Kolonien, die sich aus kurzen, schlanken, gut gekrümmt. Stäbchen zusammensetzen = Stamm D. 3.	Spärliche, zarte, graubraune Kolonien, die von zarten, schlanken, gut gekrümmten Stäbchen gebild. werden N. 1.	1. Zahlreiche, rauchbraune, choleraähnliche Kolonien, die von zarten, schlanken, gut gekrümmten Stäbchen gebildet werden = Stamm E. 4. 2. Vereinzelte, trübgraue Kolonien aus ziemlich plumpen Stäbchen bestehend = Stamm E. 5. 3. Vereinzelte, hellgraue, ziemlich große Kolonien, aus kurzen, dicken, plumpen Stäbchen bestehend = Stamm E. 6. 4. Vereinzelte, dunkelbraune Kolonien, die von feinen, zarten Stäbchen gebildet werden = Stamm E 7.
Stuhl Nr. 4	1. Vereinzelte, äußerst feine, zarte, durchscheinende Kolonien, die aus großen Kokken bestehen, vermischt mit einzeln. dicken, plumpen Stäbchen. 2. 29 gelbweiße, saftige Kolonien aus großen, dicken, plumpen Kokken zusammengesetzt.	Wie Dieudonné 1.	Reichliches Wachstum von ziemlich großen, weißgrauen Kolonien, die von sehr kurzen, dicken, plumpen Stäbchen gebildet werden = Stamm E. 8.

Nummer des Stuhles	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Neufeld und Woithe modifizierten Nährboden	Wachstum auf dem nach Esch modifizierten Nährboden
Stuhl Nr. 5	Sehr spärliche, äußerst feine, durchscheinende Kolonien, die von sehr kurzen, plumpen, dicken kokkenähnlichen Stäbchen gebildet werden = Stamm D. 4.	Steril.	Üppiges Wachstum von ziemlich großen, hellgrauen Kolonien, aus sehr kurzen, dicken, plumpen Stäbchen bestehend = Stamm E. 9.
Stuhl Nr. 6	1. Zahlreiche, äußerst feine, farblose Kolonien, von zieml. groß. Kokken. 2. Vereinzelte, rauchbraune, choleraähnliche Kolonien, die sich aus zarten, schlanken, gut gekrümmten Stäbchen zusammensetzen = Stamm D. 5.	Zahlreiche äußerst feine, farblose Kolonien von großen Staphylokokken.	1. Sehr reichliche, feine, rauchbraune Kolonien in rasenförmiger Anordnung, die choleraähnliches Aussehen haben und aus dicken, plumpen Stäbchen bestehen = Stamm E. 10. 2. Vereinzelte, graubraune Kolonien (etwas größer als 1), die sich größtenteils aus zarten, schlanken, gut gekrümmten Stäbchen (Vibrionen) und aus vereinzelten dicken, plumpen Stäbchen (= Stamm E 10) zusammensetzen = Stamm E. 11.
Stuhl Nr. 7	1. Ziemlich reichliche Entwicklung von großen rauchbraunen Kolonien, die aus mittelschlanken, gut gekrümmten Stäbchen bestehen = Stamm D. 6. 2. Vereinzelte, feine, weißgraue Kolonien, von plumpen, sehr kurzen, kokkenähnlichen Stäbchen gebildet = Stamm D. 7. 3. Spärl., äußerst feine, farblose Kolonien von großen Kokken.	Steril.	1. Üppiges Wachstum von zarten, rauchbraunen, choleraähnlichen Kolonien, aus mittelschlanken, gut gekrümmten Stäbchen zusammengesetzt = Stamm E. 12. 2. Vereinzelte, sehr feine, weißgraue Kolonien, die aus plumpen, sehr kurzen, kokkenähnlichen Stäbchen bestehen = Stamm E. 13.
Stuhl Nr. 8	Sehr mäßiges Wachstum von feinsten, zarten, farblosen Kolonien, aus Micrococcus tetragenus bestehend.	Wie Dieud. Nährboden.	Sehr zahlreiche, ziemlich große, graubraune, choleraähnliche Kolonien, die von plumpen, teilweise schwach gekrümmten Stäbchen gebildet werden = Stamm E. 14.

Nummer des Stuhles	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Neufeld und Woithe modifizierten Nährboden	Wachstum auf dem nach Esch modifizierten Nährboden
Stuhl Nr. 9	Spärliche, äußerst feine, farblose, zarte Kolonien von Micrococcus tetragenus.	Wie Dieud. Nährboden.	Reichliche Entwicklung von zarten graubraunen, choleraähnlichen Kolonien, aus plumpen, kurzen Stäbchen von mittlerer Dicke bestehend = Stamm E. 15.
Stuhl Nr. 10	Wenige, äußerst feine, farblose Kolonien, von Streptokokken gebildet.	Wie Dieud. Nährboden.	1. Üppiges Wachstum von ziemlich großen, grauen Kolonien, choleraähnlich, die aus kurzen, plumpen, teilweise gekrümmten Stäbchen sich zusammensetzen = Stamm E. 16. 2. Spärliche, sehr feine, zarte Kolonien von Diplokokken.
Stuhl Nr. 11	1. Spärl. Wachstum äußerst feiner, zarter, farbloser Kolonien von Kokken. 2. 2 größere, weißgraue, undurchsichtige Kolonien aus großen Diplokokken zusammengesetzt.	Steril.	1. Spärliche, äußerst feine, farblose, zarte Kolonien von Kokken. 2. 139 ziemlich große, trübgraue Kolonien, die aus großen Diplokokken bestehen.
Stuhl Nr. 12	Spärliche Entwicklung von feinsten, weißgrauen Kolonien von Kokken gebildet.	Steril.	Wie Dieudonnéscher Nährboden.
Stuhl Nr. 13	1. Mäßig. Wachstum sehr feiner, zarter, farbloser, von Diplokokken gebildeter Kolonien. 2. 12 weißgelbe, kleine Kolonien, die sich aus großen Kokken zusammensetzen.	Wie Dieudonné 1.	1. Reichliches Wachstum von mattgrauen, choleraähnlichen, zarten Kolonien, die sich aus dicken, plumpen, an den Enden abgerundeten Stäbchen zusammensetzen = Stamm E. 17. 2. 34 große, hellgraue Kolonien, die sich aus kurzen, dicken, plumpen Stäbchen zusammensetzen = Stamm E. 18.
Stuhl Nr. 14	Zieml. reichliche Entwicklung von kleinen, gelbweißen, üppigen Kolonien, die aus großen, dicken Kokken bestehen.	Spärl., sehr feine, große, farblose Kolonien aus Diplokokken bestehend.	1. Üppiges Wachstum von zarten, mattgrauen, durchscheinenden choleraähnlichen Kolonien, die von dicken, plumpen, zum Teil schwach gekrümmten Stäbchen gebildet werden = Stamm E. 19. 2. 34 ziemlich große, hellgraue, flache Kolonien, aus kurzen, dicken, kokkenähnlichen Stäbchen zusammengesetzt = Stamm E. 20.

Nummer des Stuhles	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Neufeld und Woithe modifizierten Nährboden	Wachstum auf dem nach Esch modifizierten Nährboden
Stuhl Nr. 15	1. Spärl., feinste, sehr zarte Kolonien, aus Diplokokken bestehend. 2. Vereinzelte, gelbbraune Kolonien, die sich aus dicken, plumpen, sehr kurzen Stäbchen zusammensetzen = Stamm D.8.	Wie Dieudonné 1.	1. Reichliches Wachstum, von durchscheinenden, zarten, mattgrauen choleraähnlichen Kolonien, die von kurzen, dicken, plumpen, vielfach bipolar gefärbten Stäbchen gebildet werden = Stamm E. 21. 2. Spärliche, zarte, kleine, durchscheinende Kolonien, die sich aus kurzen, zum Teil gekrümmten, dicken Stäbchen zusammensetzen = Stamm E. 22.
Stuhl Nr. 16	Spärliches Wachstum von sehr feinen, farblosen, durchscheinenden Kolonien von Staphylokokken.	Wie Dieudonné.	1. Zahlreiche mittelgroße, rauchbraune, choleraähnliche Kolonien, aus kurzen, dicken, plumpen Stäbchen bestehend = Stamm E. 23. 2. Ziemlich reichliches Wachstum, von mattgrauen, etwas kleineren Kolonien, die sich aus schlanken, gut gekrümmten Stäbchen zusammensetzen. Vibrionen = Stamm E. 24. 3. Zahlreiche, äußerst feine, durchsichtige Staphylokokkenkolonien.
Stuhl Nr. 17	Steril.	Einzelne, sehr zarte, durchscheinende, aus kleinen Diplokokken bestehende Kolonien.	Dickes, rasenartiges Wachstum von zarten, durchscheinenden, mattgrauen Kolonien, die sich aus kurzen, dicken, an den Enden abgerundeten Stäbchen zusammensetzen = Stamm E. 25.
Stuhl Nr. 18	Steril.	1. Spärl., zarte, äußerst feine, aus Streptokokken bestehende Kolonien 2. Spärliche, sehr feine, gelbbraune Kolonien von Staphylokokken.	Reichliche Entwicklung von zarten, rauchbraunen, durchscheinenden, choleraähnlichen Kolonien, die von dicken, kurzen, plumpen Stäbchen gebildet werden = Stamm E. 26.
Stuhl Nr. 19	Steril.	5 vereinzelte, kleine, gelbweiße, undurchsichtige Kolonien von Staphylokokken.	1. Dickes, rasenförmiges Wachstum von zarten, durchscheinenden, rauchbraunen, choleraähnlichen Kolonien von dicken, kurzen, plumpen Stäbchen = Stamm E. 27. 2. Vereinzelte, gelbweiße, kleine Kolonien von Staphylokokken.
Stuhl Nr. 20	Spärliche, feinste, zarte Kolonien von Diplokokken.	Wie Dieudonné.	Sehr zahlreiche, mattgraue, flache Kolonien, choleraähnlich, die aus zarten, schlanken, teilweise gut gekrümmten Stäbchen bestehen = Stamm E. 28.

Nummer des Stuhles	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Neufeld und Woithe modifizierten Nährboden	Wachstum auf dem nach Esch modifizierten Nährboden
Stuhl Nr. 21	4 vereinzelte kleine, gelbweiße, aus großen Diplokokken bestehende Kolonien.	3 gelbweiße, kleine Kolonien von großen Diplokokken.	1. Zahlreiche, mattgraue, flache Kolonien, die aus dicken, kurzen, plumpen Stäbchen bestehen = Stamm E. 29. 2. Reichliches Wachstum von rauchbraunen, zarten, choleraähnlichen Kolonien, die sich aus dicken, kurzen, plumpen Stäbchen zusammensetzen = Stamm E. 30.
Stuhl Nr. 22	Mäßiges Wachstum v. zarten, rauchbraunen, durchscheinenden Kolonien, die aus gut gekrümmten, zarten, schlanken Stäbchen bestehen. Vibrionen = Stamm D. 9.	1. Spärl., äußerst feine, farblose Kolonien v. Diplokokken. 2. 51 mittelgroße, rauchbraune, choleraähnliche durchscheinende Kolonien, die aus zarten, schlanken, gut gekrümmten Stäbchen (Vibrionen) bestehen = N. 2.	1. Dicke, rasenförmige Entwicklung von zarten, rauchbraunen, choleraähnlichen, durchscheinenden Kolonien, die aus dicken, plumpen, kurzen Stäbchen bestehen = Stamm E. 31. 2. Spärliche, ziemlich große, graue Kolonien, die sich aus kurzen, dicken, plumpen Stäbchen zusammensetzen = Stamm E. 32.
Stuhl Nr. 23	Mäßiges Wachstum sehr feiner farbloser Kolonien, die teils v. Diplokokken, teils von Micrococcus tetragenus gebildet werden.	Steril.	1. Üppige, rasenförmige Entwicklung von mattgrauen, mittelgroßen, flachen Kolonien, die aus kurzen, dicken, plumpen Stäbchen zusammengesetzt sind = Stamm E. 33. 2. Vereinzelte, hellgraue, choleraähnliche Kolonien, von zarten, schlanken, feinen Stäbchen = Stamm E. 34. 3. 40 gelbbraune, saftige, mittelgroße Kolonien, aus kurzen, dicken, zum Teil schwach gekrümmten Stäbchen bestehend = Stamm E. 35.
Stuhl Nr. 24	1. Spärl., äußerst feine, zarte, farblose Kolonien von Diplokokken. 2. Vereinzelte, größere, rauchbraune, choleraähnliche Kolonien, die aus schwach gekrümmten, zarten Stäbchen, von mittlerer Dicke gebildet werden. Vibrionen = Stamm D. 10.	Steril.	1. Reichliches Wachstum von mattgrauen, flachen, zarten Kolonien, die sich aus dicken, plumpen, zum Teil schwach gekrümmten Stäbchen zusammensetzen = Stamm E. 36. 2. Einzelne größere, rauchbraune, choleraähnliche Kolonien von mittelstarken, zarten, schwach gekrümmten Stäbchen = Stamm E. 37 (Vibrionen).

Nummer des Stuhles	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Neufeld und Woithe modifizierten Nährboden	Wachstum auf dem nach Esch modifizierten Nährboden
Stuhl Nr. 25	Mäßiges Wachstum feinster, zarter, farbloser Kolonien, die aus Diplokokken bestehen.	Steril.	Sehr reichliche Entwicklung von mattgrauen, flachen, zarten Kolonien, die von dicken, plumpen, kurzen Stäbchen gebildet werden = Stamm E. 38.
Stuhl Nr. 26	Spärliches Wachstum feinster, durchscheinender Kolonien von kleinen Diplokokken.	Wie Dieudonné.	1. Sehr zahlreiche, mattgraue, flache, kleine Kolonien, die sich aus dicken, plumpen Stäbchen zusammensetzen = Stamm E. 39. 2. 19 einzelne, größere, rauchbraune, choleraähnliche Kolonien, die von ziemlich langen, schlanken, zum Teil gekrümmten Stäbchen gebildet werden = Stamm E. 40.
Stuhl Nr. 27	Zahlreiche, äußerst feine, farblose Kolonien, die aus kleinen Diplokokken bestehen.	Steril.	1. Reichliche Entwicklung von mattgrauen, kleinen, flachen Kolonien, die von kurzen, dicken, plumpen Stäbchen gebildet werden = Stamm E. 41. 2. Ca. 30 einzelne, größere, rauchbraune, choleraähnliche Kolonien, die sich aus geraden, dicken, plumpen Stäbchen von mittlerer Länge zusammensetzen = Stamm E. 42.
Stuhl Nr. 28	Zwei mittelgroße, rauchbraune, flache Kolonien, die sich aus dicken, plumpen, milzbrandähnlichen Stäbchen zusammensetzen = Stamm D. 11.	Steril.	Dickes, rasenförmiges Wachstum, von mittelgroßen, graubraunen, choleraähnlichen Kolonien, die sich teils aus dickeren, teils aus dünneren kurzen Stäbchen zusammensetzen = Stamm E. 43.
Stuhl Nr. 29	1. Zahlreiche, mittelgroße, hellgraue, flache Kolonien, die von mittellangen, schlanken, ziemlich gut gekrümmten Stäbchen gebildet werden = Stamm D. 12. 2. Spärliche, sehr feine, äußerst zarte Staphylokokkenkolonien.	Wie Dieudonné 1 u. 2, N. 3.	Üppiges Wachstum von kleinen hellgrauen, bezw. rauchbraunen, choleraähnlichen Kolonien, die aus mittellangen, schlanken, ziemlich gut gekrümmten Stäbchen bestehen = Stamm E. 44.

Nummer des Stuhles	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Neufeld und Woithe modifizierten Nährboden	Wachstum auf dem nach Esch modifizierten Nährboden
Stuhl Nr. 30	1. Reichl. Wachstum v. zarten, durchscheinenden feinen Kolonien, die aus kurzen, schlanken, gut gekrümmten Stäbchen bestehen = Stamm D. 13. 2. Vereinz., weißgraue, undurchsichtige, kleine Kolonien von mittelgroßen Kokken.	Wie Dieudonné N. 4.	1. Dickes, rasenförmiges Wachstum, von zarten, durchscheinenden, choleraähnlichen Kolonien, die von dicken, kurzen, plumpen Stäbchen gebildet werden = Stamm E. 45. 2. 48 ziemlich große, mattgraue, flache Kolonien, die sich aus feinen, schlanken, mäßig gekrümmten Stäbchen zusammensetzen = Stamm E. 46.
Stuhl Nr. 31	Spärliche, zieml. große, rauchbraune, flache Kolonien, die aus langen, schlanken, gekrümmten Stäbchen sich zusammensetzen (Vibrionen) = Stamm D. 14.	Steril.	1. Ziemlich reichliche Entwicklung von zarten, durchscheinenden, etwas rauchbraunen Kolonien, die aus langen, schlanken, stark gekrümmten Stäbchen bestehen (Vibrionen) = Stamm E. 47. 2. Vereinzelte, ziemlich große, hellgraue, von dicken, plumpen, kurzen Stäbchen gebildete Kolonien = Stamm E. 48.
Stuhl Nr. 32	Vereinzelte, äußerst feine, farblose Kolonien von Diplokokken.	Wie Dieudonné.	Zahlreiche, mittelgroße, hellgraue, zentral getrübte, saftige Kolonien von kurzen, dicken, plumpen, teilweise schwach gekrümmten Stäbchen = Stamm 49.
Stuhl Nr. 33	1. Zahlr., äußerst feine, kleinst., durchscheinende Diplokokkenkolonien. 2. Zahlreiche, mittelgroße, rauchbraune, choleraähnliche Kolonien, die aus mittellangen, sehr dünnen, schlanken, gut gekrümmten Stäbchen bestehen = D. 15.	—	1. Üppiges, rasenförmiges Wachstum von feinen, mattgrauen, durchscheinenden Kolonien, die aus sehr kurzen, dicken, plumpen Stäbchen sich zusammensetzen = Stamm 50. 2. Zahlreiche, trübgraue, undurchsichtige, saftige Kolonien, die aus kurzen, dünnen, schwach gekrümmten Stäbchen bestehen = Stamm E. 51.
Stuhl Nr. 34	Steril.	—	Sehr zahlreiche, saftige, glänzende, hellgraue, zentral getrübte Kolonien, die sich aus kurzen, mitteldicken, teilweise schwach gekrümmten Stäbchen zusammensetzen = Stamm E. 52.
Stuhl Nr. 35	Zahlr., feinste, äußerst zarte, farbl. Kolonien, die aus Diplokokken bestehen.	—	Dicke Rasen, von zarten, hellgrauen mittelgroßen, glänzenden Kolonien, die aus kurzen, dicken, plumpen Stäbchen bestehen = Stamm E. 53.

Tabelle IV. Untersuchung von Stuhlausstrichen.

Nummer des Stuhles	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem in getrockneter Form aufbewahrten Dieudonnéschen Nährboden
Stuhl Nr. 1	Vereinzelte, sehr feine, farblose Kolonien von Staphylokokken.	1. Sehr reichliches Wachstum von rauchbraunen, undurchsichtigen, flachen Kolonien, die von kurzen, dicken, plumpen Stäbchen gebildet werden = Stamm K. 1. 2. Vereinzelte, sehr kleine, hellgraue Kolonien von Staphylokokken.
Stuhl Nr. 2	Steril.	Dickes, rasenförmiges Wachstum, von undurchsichtigen, mittelgroßen, rauchbraunen, flachen Kolonien, die aus dicken, kurzen, plumpen Stäbchen zusammengesetzt sind = Stamm K. 2.
Stuhl Nr. 3	Steril.	1. Sehr zahlreiche, äußerst feine, farblose, durchsichtige Kolonien, von kleinen Diplokokken. 2. Ziemlich reichliche Entwicklung von mittelgroßen, rauchbraunen, choleraähnlichen Kolonien, die aus ziemlich langen, gut gekrümmten, schlanken Stäbchen bestehen (Vibrionen) = Stamm K. 3.
Stuhl Nr. 4	Steril.	Zahlreiche, sehr kleine, durchscheinende Kolonien, die aus Streptokokken, vermischt mit ganz vereinzelten dicken, plumpen Stäbchen, bestehen.
Stuhl Nr. 5	Steril.	Spärliches Wachstum äußerst feiner, farbloser Kolonien von kleinen Diplokokken.
Stuhl Nr. 6	Zahlreiche, rauchbraune, mittelgroße, flache Kolonien, die sich aus ziemlich langen, schlanken, gut gekrümmten Stäbchen zusammensetzen = Stamm D. 16.	Üppiges Wachstum in Rasenform von flachen, graubraunen, mittelgroßen, saftigen Kolonien, die aus ziemlich langen, schlanken, gut gekrümmten Stäbchen bestehen = Stamm K. 4.
Stuhl Nr. 7	Spärliche, äußerst feine, farblose Kolonien, die aus großen, plumpen Staphylokokken bestehen.	1. Dickes, rasenförmiges Wachstum von kleinen, hellgrauen, glänzenden Kolonien, die sich aus sehr kurzen, dicken, plumpen, kokkenähnlichen Stäbchen zusammensetzen = Stamm K. 5. 2. Dazwischen verstreut, einzelne größere, saftige, mattgraue, zentralgetrübte Kolonien, die überwiegend aus schlanken, dünnen, zum Teil schwach gekrümmten Stäbchen bestehen, und daneben vereinzelte, sehr kurze, dicke, plumpe Stäbchen (= Kd. 5) aufweisen = Stamm K. 6.
Stuhl Nr. 8	Steril.	1. Üppige Entwicklung von hellgrauen, zarten, glänzenden Kolonien, die von kurzen, plumpen Stäbchen gebildet werden = Stamm K. 7. 2. Spärliches Wachstum äußerst feiner, farbloser Kolonien von Staphylokokken.

Nummer des Stuhles	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem in getrockneter Form aufbewahrten Dieudonnéschen Nährboden
Stuhl Nr. 9	Zahlreiche, äußerst feine, durchsichtige Kolonien von großen Diplokokken.	1. Reichliche, feine, hellgraue, zentralgetrübte Kolonien, die aus kurzen, dicken, plumpen, leichtgekrümmten Stäbchen bestehen = Stamm K. 9. 2. Vereinzelte, größere, graue, undurchsichtige Kolonien, die von mittellangen, schlanken, gut gekrümmten Stäbchen gebildet werden = Stamm K. 8.
Stuhl Nr. 10	Vereinzelte, äußerst feine, durchscheinende Kolonien v. Diplokokken.	Spärliche, zarte, kleinste, farblose Kolonien von Streptokokken.
Stuhl Nr. 11	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von zarten, graubraunen, choleraähnlichen Kolonien, die aus zarten, schlanken, gut gekrümmten Stäbchen von mittlerer Länge gebildet werden = Stamm D. 17.	Dickes, üppiges Wachstum von zarten, rauchbraunen, choleraähnlichen Kolonien, die sich aus zarten, schlanken, gut gekrümmten, mittellangen Stäbchen zusammensetzen = Stamm K. 10.
Stuhl Nr. 12	Etwa 40 ziemlich große, saftige, graubraune Kolonien, die von kurzen, schlanken, gut gekrümmten Stäbchen gebildet werden = Stamm D. 18.	1. Dicke, üppige Rasen, von feinen, kleinen, hellgrauen Kolonien, die sich aus kurzen, schlanken, gut gekrümmten Stäbchen zusammensetzen = Stamm K. 11. 2. 31 vereinzelte, größere, weißgraue, saftige Kolonien von kurzen, dicken, schwach gekrümmten Stäbchen = Stamm K. 12.
Stuhl Nr. 13	Steril.	Steril.
Stuhl Nr. 14	Vereinzelte, sehr feine, kleine, farblose Kolonien von Diplokokken.	Zahlreiche ziemlich große, glänzende, zentralgetrübte, hellgraue Kolonien, die aus Diplokokken bestehen.
Stuhl Nr. 15	Reichliches Wachstum v. kleinen, flachen, zarten, rauchbraunen Kolonien, die sich aus Diplokokken zusammensetzen.	Sehr zahlreiche, glänzende, mittelgroße, zentralgetrübte, hellgraue Kolonien von Diplokokken.
Stuhl Nr. 16	Spärliche, äußerst feine, farblose Diplokokkenkolonien.	Ziemlich reichliche Entwicklung von hellgrauen, zentralgetrübten, saftigen Kolonien, die aus sehr kurzen, geraden Stäbchen von mittlerer Dicke bestehen = Stamm K. 13.
Stuhl Nr. 17	Spärliche, äußerst feine, farblose Diplokokkenkolonien	52 einzel stehende, ziemlich große, gelbweiße, glänzende, saftige Kolonien, die sich aus großen, dicken, ziemlich plumpen Kokken zusammensetzen.
Stuhl Nr. 18	Spärliche, äußerst feine, farblose Kolonien von Streptokokken.	Wie auf Dieudonné-Agar.
Stuhl Nr. 19	1. Zahlreiche, mittelgroße, saftige, rauchbraune, choleraähnliche Kolonien, die sich aus mittellangen, sehr dünnen, gut gekrümmten Stäbchen zusammensetzen. Vibrionen = Stamm D. 19. 2. Zahlreiche, äußerst feine, farblose Kolonien von Diplokokken.	Sehr zahlreiche, hellgraue, zentralgetrübte, große, saftige Kolonien, die aus ziemlich kurzen, schlanken, sehr dünnen, gut gekrümmten Stäbchen bestehen. Vibrionen = Stamm K. 14.

Tabelle V. Untersuchung von Stuhlausstrichen.

Nummer des Stuhles	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Pilon modifizierten Nährboden
Stuhl Nr. 1	Spärliches Wachstum feinster, durchscheinender Kolonien, die aus sehr kurzen, mitteldicken Stäbchen bestehen = D. 20.	Reichliches Wachstum sehr feiner, zarter, etwas milchig schimmernder Kolonien, die aus sehr kurzen, mitteldicken Stäbchen bestehen = P. 1.
Stuhl Nr. 2	Vereinzelte, äußerst feine, zarte, durchscheinende Kolonien von Staphylokokken.	Steril.
Stuhl Nr. 3	Spärliches Wachstum feinster, durchscheinender Kolonien, die sich aus Staphylokokken zusammensetzen.	Spärliches Wachstum sehr zarter, durchscheinender Kolonien, die von kurzen, dicken, plumpen Stäbchen gebildet werden = P. 2.
Stuhl Nr. 4	Zahlreiche, feinste, durchscheinende Kolonien von Staphylokokken.	Wie auf Dieudonné-Agar.
Stuhl Nr. 5	1. Zahlreiche, hellgraue (etwas heller wie Cholera), zarte Kolonien, die aus langen, schlanken, zum Teil gut gekrümmten Stäbchen bestehen = D. 21. 2. Spärliche, dazwischen gelagerte, sehr feine, durchscheinende Kolonien von Staphylokokken.	1. Üppiges, rasenförmiges Wachstum von hellgrauen, zarten, mittelgroßen, choleraähnlichen Kolonien, die aus langen, schlanken, größtenteils schwach gekrümmten Stäbchen bestehen = P. 3. 2. Vereinzelte, zarte, trübgraue Kolonien, die von teils kürzeren, teils längeren, dicken, geraden Stäbchen gebildet werden = P. 4.
Stuhl Nr. 6	Steril.	Steril.
Stuhl Nr. 7	Spärliche, feinste, trübgraue Kolonien, die sich aus großen Staphylokokken zusammensetzen.	Reichliche Entwicklung von feinen, teils trüben, teils durchscheinenden Kolonien, die aus sehr kurzen, mitteldicken Stäbchen bestehen = P. 5.
Stuhl Nr. 8	1. Zahlreiche, zarte, rauchbraune, choleraähnliche Kolonien, die aus sehr kurzen, dicken, plumpen, geraden Stäbchen bestehen = D. 22. 2. Zahlreiche, mittelgroße, weißgraue, undurchsichtige, saftige Kolonien, die von Diplokokken gebildet werden.	1. Zahlreiche, milchgraue, undurchsichtige, mäßig große Kolonien, die sich aus sehr kurzen, geraden, mitteldicken Stäbchen zusammensetzen = P. 6. 2. Ziemlich reichliches Wachstum von feinsten, zarten, durchscheinenden Kolonien, die aus Staphylokken bestehen.
Stuhl Nr. 9	1. Spärliches Wachstum von feinen, zarten, abgeflachten, durchscheinenden Kolonien, die aus sehr kurzen, geraden, schlanken Stäbchen bestehen = D. 23. 2. Dazwischen verstreut, spärliche, kleinste, trübe Kolonien von Staphylokokken.	Sehr reichliches Wachstum von kleinen, milchig getrübten, glänzenden Kolonien, die von sehr kurzen, geraden, schlanken Stäbchen gebildet werden = P. 7.

Nummer des Stuhles	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Pilon modifizierten Nährboden
Stuhl Nr. 10	Sehr zahlreiche, kleine, leicht milchig getrübte, glänzende Kolonien, die von kurzen, zum Teil geraden, zum Teil schwach gekrümmten, mitteldicken Stäbchen gebildet werden = D. 24.	Üppiges Wachstum von innig gemischten, teils schwach irisierenden, teils durchsichtigen, zarten Kolonien, die teils aus mäßig langen, schlanken, geraden, teils aus dicken, kurzen, plumpen Stäbchen bestehen = P. 8.
Stuhl Nr. 11	Ziemlich reichliche Entwicklung von feinen, zarten, durchscheinenden Kolonien, die sich aus mittellangen, geraden, plumpen Stäbchen zusammensetzen = D. 25.	1. Reichliches Wachstum von hellgrauen, schwach durchscheinenden, glänzend., choleraähnlichen Kolonien, die von teils längeren, teils kürzeren mehr oder weniger schlanken, geraden Stäbchen gebildet werden = P. 9. 2. Dazwischen spärliche, feinste, durchscheinende Kolonien von Streptokokken.
Stuhl Nr. 12	Reichliches Wachstum von zarten, mattgrauen, flachen Kolonien, die aus kurzen, mäßig dicken, geraden Stäbchen bestehen = D. 26.	Üppiges Wachstum von glänzenden, zerfließenden, zentral milchig getrübten, flachen Kolonien, die aus kurzen, mäßig dicken, geraden Stäbchen sich zusammensetzen = P. 10.
Stuhl Nr. 13	Zahlreiche, sehr feine, trübe Kolonien, die von sehr kurzen, dicken, plumpen Stäbchen gebildet werden = D. 27.	Zahlreiche feine, saftige, glänzende, undurchsichtige Kolonien, die aus sehr kurzen, dicken, plumpen Stäbchen bestehen = P. 11.
Stuhl Nr. 14	1. Reichliche Entwicklung von grauen, glänzenden, undurchsichtigen Kolonien, die sich aus kurzen, plumpen, geraden Stäbchen zusammensetzen = D. 28. 2. Sehr zahlreiche, feinste, durchscheinende Kolonien von Staphylokokken.	1. Zahlreiche hellgraue, glänzende, zerfließende Kolonien, die von sehr kurzen, mitteldicken, geraden Stäbchen gebildet werden = P. 12. 2. Sehr zahlreiche feinste, durchscheinende Kolonien von Staphylokokken.
Stuhl Nr. 15	1. Ziemlich reichliches Wachstum von innig gemischten, teils rauchbraunen, choleraähnlichen, teils etwas mehr hellgrauen, glänzenden, mittelgroßen Kolonien, die aus kurzen, dicken, geraden Stäbchen bestehen = D. 29. 2. Dazwischen verstreut, ganz flache, ziemliche große, an der Oberfläche eigenartig gefältelte Kolonien, die von sehr kurzen, ziemlich dicken, geraden Stäbchen gebildet werden = D. 30.	1. Üppiges Wachstum von hellgrauen, mittelgroßen, glänzenden, choleraähnlichen Kolonien, die aus kurzen, dicken, plumpen Stäbchen sich zusammensetzen = P. 13. 2. Wie auf Dieudonné-Agar = P. 14.
Stuhl Nr. 16	Üppiges Wachstum von hellgrauen, leicht milchig getrübten, glänzenden, mittelgroßen Kolonien, die aus sehr kurzen, dicken, geraden Stäbchen bestehen = D. 31.	Üppiges rasenförmiges Wachstum von hellgrauen, mittelgroßen, glänzenden, zerfließenden Kolonien, die aus sehr kurzen, geraden Stäbchen von mittlerer Dicke sich zusammensetzen = P. 15.
Stuhl Nr. 17	Zahlreiche, feine, rauchbraune, durchscheinende Kolonien, etwas kleiner, als bei Cholera, die von kurzen, dicken, plumpen Stäbchen gebildet werden = D. 32.	Üppiges Wachstum von großen, hellgrauen, zentral etwas milchig getrübten, glänzenden Kolonien, die aus sehr kurzen, dicken, plumpen, kokkenähnlichen Stäbchen bestehen = P. 16.

Nummer des Stuhles	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Pilon modifizierten Nährboden
Stuhl Nr. 18	1. Dichtes, rasenförmiges Wachstum von kleinen, zarten, durchscheinenden Kolonien, die aus kurzen, dicken, plumpen, geraden Stäbchen bestehen = D. 33. 2. Dazwischen verstreut zahlreiche größere, mattgraue, glänzende Kolonien, die von teils kurzen, teils längeren, bald geraden, bald schwach gekrümmten, schlanken, meist segmentiert gefärbten Stäbchen gebildet werden = D. 34.	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von hellgrauen, großen, zentral milchig getrübten, glänzenden Kolonien, die von kurzen, mäßig dicken, geraden Stäbchen gebildet werden = P. 17.
Stuhl Nr. 19	Steril.	Spärliche, ziemlich große, hellgraue, glänzende, in der Mitte leicht weißlich getrübte Kolonien, die aus kurzen, geraden Stäbchen bestehen = P. 18.
Stuhl Nr. 20	Steril.	Vereinzelte, große, hellgraue, zentral milchig getrübte, glänzende Kolonien, die sich aus kurzen, mäßig dicken, geraden Stäbchen zusammensetzen = P. 19.
Stuhl Nr. 21	Sehr reichliche Entwicklung von zarten, durchscheinenden, kleinen Kolonien, die von langen, meist geraden, mitteldicken Stäbchen gebildet werden = D. 35.	Üppiges Wachstum von hellgrauen, zentral milchig getrübten, glänzenden Kolonien, die aus sehr kurzen, dicken, plumpen Stäbchen bestehen = P. 20.
Stuhl Nr. 22	Zahlreiche, hellgraue, glänzende, ziemlich kleine Kolonien, die aus kurzen, geraden, schlanken Stäbchen bestehen = D. 36.	Sehr reichliche Entwicklung von hellgrauen, glänzenden, zerfließenden Kolonien, die von kurzen, geraden, schlanken Stäbchen gebildet werden = P. 21.
Stuhl Nr. 23	1. Zahlreiche, gelbweiße, kleine, trübe, saftige Kolonien von Staphylokokken. 2. Vereinzelte, helle, durchscheinende, mittelgroße Kolonien, die aus kurzen, plumpen, geraden Stäbchen bestehen = D. 37.	1. Wie auf Dieudonné-Agar. 2. Zahlreiche helle, ziemlich große, zentral milchig getrübte, glänzende Kolonien, die von teils sehr kurzen, dicken kokkenähnlichen, teils längeren, mitteldicken, geraden Stäbchen gebildet werden = P. 22.
Stuhl Nr. 24	Steril.	Reichliches Wachstum von hellgrauen, zentral milchig getrübten, glänzenden Kolonien, die sich aus sehr kurzen, dicken, plumpen Stäbchen zusammensetzen = P. 23.
Stuhl Nr. 25	Zahlreiche, feinste, durchscheinende Kolonien von Staphylokokken.	Sehr reichliche Entwicklung von hellgrauen, mittelgroßen, glänzenden Kolonien, die aus kurzen, mitteldicken, geraden Stäbchen bestehen = P. 24.
Stuhl Nr. 26	Reichliches Wachstum von hellgrauen, undurchsichtigen, glänzenden, mittelgroßen Kolonien, die von kurzen, dicken, plumpen, geraden Stäbchen gebildet werden = D. 38.	Sehr üppiges, rasenförmiges Wachstum, von hellgrauen, zentral milchig getrübten, glänzenden, mittelgroßen Kolonien, die aus kurzen, dicken, geraden Stäbchen bestehen = P. 25.

Nummer des Stuhles	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Pilon modifizierten Nährboden
Stuhl Nr. 27	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von choleraähnlichen, etwas mehr hellgrauen, zarten Kolonien, die sich aus sehr kurzen, dicken, plumpen Stäbchen zusammensetzen = D. 39.	1. Dichte, rasenförmige Entwicklung von hellgrauen, in der Mitte weißlich getrübten, mittelgroßen, glänzenden Kolonien, die von teils kurzen, plumpen, teils längeren, schlanken, geraden Stäbchen gebildet werden = P. 26. 2. Auf diesen Kolonien aufgelagert einzelne größere, graue, undurchsichtige Kolonien, die aus langen, teilweise schwach gekrümmten, zur Fadenbildung neigenden, meist segmentiert gefärbten Stäbchen sich zusammensetzen = P. 27.
Stuhl Nr. 28	Zahlreiche, zarte, durchscheinende, rauchbraune, choleraähnliche Kolonien von ziemlich großen Staphylokokken.	Reichliches Wachstum von hellgrauen, zentral milchig getrübten, glänzenden, ziemlich großen, choleraähnlichen Kolonien, die aus kurzen, dicken, geraden Stäbchen bestehen = P. 28.
Stuhl Nr. 29	Steril.	1. Zahlreiche, durchscheinende, hellgraue, zentral milchig getrübte, glänzende, choleraähnliche Kolonien, die von kurzen, plumpen, geraden Stäbchen gebildet werden = P. 29. 2. Mit Kolonien von Nr. 1 reichlich vermischt, große, graue, undurchsichtige Kolonien, die aus kurzen, schlanken, geraden Stäbchen bestehen = P. 30.
Stuhl Nr. 30	Steril.	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von choleraähnlichen, hellgrauen, in der Mitte milchig getrübten, glänzenden Kolonien, die von kurzen, dicken, plumpen Stäbchen gebildet werden = P. 31.
Stuhl Nr. 31	Zahlreiche, feinste, durchscheinende Kolonien von Staphylokokken.	1. Sehr zahlreiche, rasenförmig angeordnete, hellgraue, zentral leicht getrübte, mittelgroße Kolonien, die aus kurzen, mitteldicken, geraden Stäbchen bestehen = P. 32. 2. Dazwischen verstreut einzelne, ziemlich große, undurchsichtige, gerade, flache Kolonien von Staphylokokken.
Stuhl Nr. 32	Steril.	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von hellgrauen, mäßig durchscheinenden, zerfließenden, mittelgroßen Kolonien, die aus kurzen, schlanken, geraden Stäbchen sich zusammensetzen = P. 33.
Stuhl Nr. 33	Steril.	Reichliche Entwicklung von innig miteinander gemischten, teils hellgrauen, teils mehr weißgrauen, glänzenden, saftigen Kolonien, die aus bald kürzeren, dicken, plumpen, bald längeren, schlanken, geraden Stäbchen bestehen = P. 34.

Nummer des Stuhles	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Pilon modifizierten Nährboden
Stuhl Nr. 34	Steril.	Üppiges Wachstum von zarten, choleraähnlichen, durchscheinenden, hellgrauen, zentral milchig getrübten Kolonien, die von kurzen, mitteldicken, plumpen Stäbchen gebildet werden = P. 35.
Stuhl Nr. 35	Spärliche, kleine, feine, durchscheinende, choleraähnliche Kolonien, die sich aus mittellangen, bezw. langen, meist schwach gekrümmten, schlanken Stäbchen zusammensetzen = D. 40.	1. Dichtes, rasenförmiges Wachstum von hellgrauen, durchscheinenden, choleraähnlichen, mittelgroßen Kolonien, die aus verschieden langen, schlanken, meist schwach gekrümmten Stäbchen bestehen = P. 36. 2. Dazwischen verstreut, bezw. den Kolonien Nr. 1 aufgelagert sehr zahlreiche, feinste, gelblich-weiße Kolonien von Staphylokokken.
Stuhl Nr. 36	Steril.	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von hellgrauen, zentral milchig getrübten, choleraähnlichen, mittelgroßen Kolonien, die von teils langen, schlanken, geraden, teils kurzen, dicken, plumpen Stäbchen gebildet werden = P. 37.
Stuhl Nr. 37	Steril.	Sehr reichliche Entwicklung von teils hellgrauen, durchscheinenden, teils mehr weißgrauen, trüberen Kolonien, die aus kurzen, dicken, plumpen und längeren, schlanken, geraden Stäbchen bestehen = P. 38.
Stuhl Nr. 38	1. Sehr zahlreiche, feinste, durchscheinende Kolonien von Diplokokken. 2. Dazwischen verstreut etwas größere, graue, undurchsichtige Kolonien von Staphylokokken.	Spärliche, zarte, gelbliche, undurchsichtige Kolonien von Staphylokokken.
Stuhl Nr. 39	Steril.	Zahlreiche sehr feine, durchscheinende, hellgraue Kolonien von Staphylokokken.
Stuhl Nr. 40	Zieml. reichliche Entwicklung äußerst feiner, zarter, durchscheinender Kolonien von Diplokokken.	Zahlreiche zarte, hellgraue, durchscheinende Kolonien von Staphylokokken.
Stuhl Nr. 41	Steril.	Spärliche hellgraue, feinste, durchscheinende Kolonien von Staphylokokken.
Stuhl Nr. 42	Vereinzelte, kleine, zarte, rauchbraune Kolonien, die aus kurzen, dicken, plumpen, kokkenähnlichen Stäbchen bestehen = D. 41.	Vereinzelte hellgraue, mittelgroße, durchscheinende Kolonien, die sich aus kurzen, dicken, plumpen Stäbchen zusammensetzen = P. 39.
Stuhl Nr. 43	Spärliche, äußerst feine, zarte, durchscheinende Kolonien von Staphylokokken.	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von hellgrauen, zentral leicht milchig getrübten, flachen, choleraähnlichen Kolonien, die von sehr kurzen, dicken, plumpen, kokkenähnlichen und etwas längeren, dicken, geraden Stäbchen gebildet werden = P. 40.

Nummer des Stuhles	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Pilon modifizierten Nährboden
Stuhl Nr. 44	Steril.	Reichliche Entwicklung von hellgrauen, mittelgroßen, zentral leicht getrübten, choleraähnlichen Kolonien, die aus teils kurzen, schlanken, geraden, teils sehr kurzen, dicken, plumpen Stäbchen bestehen = P. 41.
Stuhl Nr. 45	Vereinzelte, sehr kleine, gelbbraune Kolonien von Diplokokken.	Sehr reichliches Wachstum von undurchsichtigen, feinen, grauweißen, saftigen Kolonien, die aus Staphylokokken bestehen.
Stuhl Nr. 46	Ziemlich zahlreiche kleine, durchscheinende Kolonien, die von weinblattförmigem, breitem, mattem Hof umgeben sind und aus kurzen, geraden, schlanken Stäbchen sich zusammensetzen = D. 42.	Dichtes, rasenförmiges Wachstum von mittelgroßen, hellgrauen, zerfließenden Kolonien, die von kurzen, geraden, schlanken Stäbchen gebildet werden = P. 42.
Stuhl Nr. 47	Steril.	Sehr reichliche Entwicklung von mittelgroßen, flachen, hellgrauen, zentral etwas milchig getrübten Kolonien, die aus kurzen, dicken, geraden Stäbchen bestehen = P. 43.
Stuhl Nr. 48	Steril.	Üppiges Wachstum von mittelgroßen, hellgrauen, glänzenden, choleraähnlichen Kolonien, die aus teils sehr kurzen, dicken, kokkenähnlichen, teils kurzen, mitteldicken, geraden Stäbchen sich zusammensetzen = P. 44.
Stuhl Nr. 49	Ziemlich zahlreiche, feine, durchscheinende, von einem flachen, matten, weinblattförmigen Hof umgebene Kolonien, die aus kurzen, schlanken, geraden Stäbchen sich zusammensetzen = D. 43.	Üppiges, rasenförmiges Wachstum, von mittelgroßen, hellgrauen, zerfließenden Kolonien, die von kurzen, mitteldicken, geraden Stäbchen gebildet werden = P. 45.
Stuhl Nr. 50	Steril.	Sehr reichliche Entwicklung kleiner, zarter, durchscheinender Kolonien von Diplokokken.
Stuhl Nr. 51	Steril.	Steril.
Stuhl Nr. 52	Steril.	Reichliches Wachstum von kleinen, zarten, durchscheinenden Kolonien, die aus verschieden langen, schlanken, meist schwach gekrümmten Stäbchen bestehen = P. 46.
Stuhl Nr. 53	Steril.	Zahlreiche feine, sehr zarte, hellgraue Kolonien von Staphylokokken.
Stuhl Nr. 54	Vereinzelte kleinste, durchsichtige, zarte Kolonien von Diplokokken.	Wie auf Dieudonnéagar.
Stuhl Nr. 55	Steril.	1. Sehr reichliche Entwicklung von großen, hellgrauen, durchscheinenden, flachen Kolonien, die aus verschieden langen, schlanken, meist schwach gekrümmten, segmentiert gefärbten Stäbchen sich zusammensetzen = P. 47. 2. Dazwischen verstreut, hellgraue, trübere, kleinere Kolonien, die von sehr kurzen, dicken, plumpen Stäbchen gebildet werden = P. 48.

Insgesamt blieben sonach steril:

Auf dem Dieudonnéschen Originalagar von 109 Stuhlproben — 33 oder 32,7 %.

Auf der Neufeld-Woitheschen Modifikation von 32 Stuhlproben — 11 oder 34,3 %.

Auf dem Eschschen Hämoglobinagar von 35 Stuhlproben — 0 oder 0 %.

Auf dem in getrockneter Form aufbewahrten Dieudonnéschen Originalagar von 19 Stuhlproben — 1 oder 5,2 %, auf dem Pilonschen Blutsodaagar von 55 Stuhlproben — 2 oder 3,6 %.

Es sei hier bemerkt, daß die Beobachtung und Untersuchung der Platten immer, nachdem sie 20—24 Stunden bei 37° gehalten waren, erfolgte. Es wurden daher jeweils nur solche Kolonien bei der Untersuchung berücksichtigt, welche sich innerhalb dieser angegebenen Zeit bereits zu deutlich sichtbarer Größe entwickelt hatten. Die abschließende Untersuchung der Platten regelmäßig spätestens nach 24 Stunden vorzunehmen, schien uns aus dem Grunde angezeigt, weil innerhalb dieser Zeit Cholera immer ein genügend reichliches und üppiges Wachstum zeigt. Andererseits können bei länger als 24stündigem Stehen auch noch Kolonien anderer Bakterien zur Ausbildung kommen, die nach 24 Stunden noch keine deutlich wahrnehmbare Entwicklung zeigen. Verhältnismäßig häufig läßt sich dies bei Kolonien des Bac. pyoceaneus beobachten.

Darauf hinzuweisen ist ferner, daß die nach 24 Stunden auf den Elektivnährböden entwickelten Kolonien, auch wenn sie einzeln vollkommen isoliert stehen, in der Regel keine eigentliche Reinkultur darstellen. Es sind auf dem Nährboden immer noch andere Stuhlkeime vorhanden, die zwar auf dem Elektivnährdoden nicht zur Entwicklung gekommen, aber auch nicht abgestorben sind. Beim Abimpfen von Material von einer gut entwickelten und auch isoliert stehenden Kolonie auf andere Nährböden z. B. auf Agar werden nun auch solche nicht zur Entwicklung gekommene, aber dem Elektivnährboden anhaftende Keime mit auf den neuen Nährboden übertragen und kommen auf diesem dann erst zur Auskeimung.

Man kann sich daher auch bei Abimpfung von einer isoliert stehenden Kolonie nicht darauf verlassen sofort eine Reinkultur zu erhalten. Allerdings bereiten solche mitübertragenen Keime in der Regel praktisch keine Schwierigkeiten und stören in solchen Fällen meist auch die Vornahme der quantitativen Agglutination und selbst des Pfeifferschen Versuchs nicht. Man muß aber stets damit rechnen, daß die unmittelbar von den Elektivnährböden abgeimpften Agarkulturen häufig keine absoluten Reinkulturen darstellen. Entsprechende Versuche haben uns gezeigt, daß man auch von Elektivplatten, die mit Stuhlausstrichen beimpft, aber nach 2- bis 3tägiger Bebrütung bei 37° anscheinend steril geblieben waren, durch Abschwemmung mit steriler Kochsalzlösung und Verimpfung dieser auf Agarplatten dann doch noch eine reichhaltige Flora der verschiedenartigsten Darmbakterien gewinnen kann.

Bezüglich der Art der zur Entwicklung gelangten Stuhlbakterien zeigten die einzelnen Nährböden zum Teil nun ebenfalls nicht unbeträchtliche Unterschiede. Verschiedenartige Kokken kommen allerdings bei allen Nährböden ziemlich häufig zur

Entwicklung. Da ihr Wachstum aber immer entweder nur sehr spärlich ist, oder sich durch die Art der Kolonienbildung von dem echter Cholera verhältnismäßig leicht unterscheiden läßt, so kommen sie für diese Untersuchungen praktisch nicht weiter in Betracht und können hier unberücksichtigt bleiben. Rechnet man die Platten, auf denen nur Kokken zum Wachstum gekommen sind, deren Entwickelung für den Choleranachweis in keiner Weise störend gewesen wäre, den steril gebliebenen Platten zu, so ergibt sich bezügl. der wachstumhemmenden Wirkung der verschiedenen Elektivnährböden auf die übrigen Stuhlbakterien das in der Zusammenstellung der Tabelle VI wiedergegebene Bild.

Tabelle VI.

Bezeichnung des Nährbodens	Anzahl der Stuhlausstriche	Es wuchsen nur Kokken bzw. blieben steril
1. Dieudonné-Agar	109	66 = 60 %
2. Neufeld-Woithe-Agar	32	28 = 87 %
3. Getrockneter Dieudonné-Agar	19	8 = 42 %
4. Esch-Agar	35	2 = 5,7 %
5. Pilon-Agar	55	12 = 22 %

Auch bei dieser Berechnung steht bezügl. der wachstumhemmenden Wirkung auf Stuhlbakterien die Neufeld-Woithesche Modifikation an erster, der Dieudonnésche Originalagar an zweiter Stelle. Etwas weniger günstig sind die mit getrocknetem Agar erhaltenen Ergebnisse, während der Pilonsche Nährboden eine noch geringere und der Hämoglobinagar nach Esch wieder die schwächste bakterienhemmende Wirkung zeigen.

Was nun die übrigen, außer den Kokken zur Entwicklung gekommenen Stuhlbakterien anlangt, so erscheint es zunächst bemerkenswert, daß aus den 32 (Tab. III) auf dem Nährboden nach Neufeld-Woithe untersuchten Stuhlproben, abgesehen von Kokken, nur vier andere Bakterienstämme zur Entwicklung gelangt sind, von denen sich bei der weiteren Untersuchung einer als Vibrionenkultur, 3 als Alkaligenesstämme erwiesen. Aus den 109 auf dem Dieudonnéschen Originalagar untersuchten Stuhlproben (Tabelle III, IV und V) kamen, abgesehen von Kokken, 43 andere Bakterienstämme zum Wachstum, darunter 5 Vibrionen und 12 Alkaligeneskulturen. In 7 Fällen wurde der Bac. Proteus und 18 mal der Coligruppe zuzurechnende Stämme gefunden. Aus einem Stuhle konnte ferner auf diesem Nährboden ein der Coligruppe nahestehendes Stäbchen isoliert werden.

Etwas anders gestaltet sich das Verhältnis bereits bei dem in getrockneter Form aufbewahrten Blutalkaliagar. Aus 19 (Tabelle IV) mit diesem Nährboden untersuchten Stuhlproben wurden 14 Bakterienstämme gezüchtet, von denen sich 2 als Vibrionen erwiesen, während 4 der Alkaligenesgruppe, 8 der Coligruppe zugehörten. Noch mehr verschiebt sich das Bild bei dem Nährboden nach Esch, auf welchem,

abgesehen von den Kokken, aus den 35 (Tabelle III) untersuchten Stuhlproben 53 andere Bakterienstämme zur Entwicklung kamen, darunter 4 Vibrionenkulturen, 41 Stämme gehörten der Coligruppe, 7 der Alkaligenesgruppe an. In einem Falle handelte es sich um Bac. Proteus. Auf dem Pilonschen Nährboden (Tabelle V) wurden aus den 55 untersuchten Stuhlproben 48 andere Bakterienstämme isoliert und zwar 2 Paratyphus B- und 7 Bac. Proteuskulturen, sowie 5 Stämme der Alkaligenes- und 32 Stämme der Coligruppe. Eine weitere Kultur stand der Paratyphusgruppe nahe. Tabelle VII gibt eine übersichtliche Zusammenstellung der Zahl und Art der auf den einzelnen Elektivnährböden aus den Stuhlproben isolierten Bakterienstämme.

Tabelle VII.

Bezeichnung des Nährbodens (Zahl der ausgestrichenen Stuhlproben)	Zahl der isolierten Stämme	Art der Kulturen					Zahl der Colistämme in % berechnet
		Vibrionen	Bac. faec. alcalig.	Bac. proteus	Bac. coli	Sonstige	
1. Dieudonné-Agar (109 Stühle)	43	5	12	7	18	1	41,8 %
2. Getrockneter Dieudonné-Agar (19 Stühle)	14	2	4	—	8	—	57,1 %
3. Neufeld-Woithe-Agar (32 Stühle)	4	1	3	—	—	—	—
4. Esch-Agar (35 Stühle)	53	4	7	1	41	—	77,3 %
5. Pilon-Agar (55 Stühle)	48	—	5	8	32	3 (darunter 2 Paratyph. B.)	66,6 %

In diesen Versuchsreihen, welche, wie erwähnt, regelmäßig spätestens nach 24 Stunden abgeschlossen wurden, kamen sonach auf den Elektivnährboden abgesehen von verschiedenen Kokken nur der Bacillus Proteus, einzelne Vibrionenkulturen, sowie der Alkaligenes- und der Coligruppe zugehörige oder nahestehende Bakterien, sowie 2 Paratyphusstämme zur Entwicklung. Während aber auf den Platten der Modifikation nach Neufeld-Woithe nur Vibrionen und Alkaligenesstämme gewachsen waren, gehörten von den auf den Platten des Eschschen Nährbodens isolierten 53 Bakterienstämmen 41 oder 77,3 % der Coligruppe an. Unter den auf dem Pilonschen Blutsodaagar isolierten 48 Kulturen waren 32 oder 66,6 % Colistämme.

Auch von den auf den Platten des in getrockneter Form aufbewahrten Dieudonnéschen Agars gewachsenen 14 verschiedenen Stämmen gehörten 8 oder 57,1 % der Coligruppe an, während von den 43 auf dem Dieudonnéschen Originalagar isolierten Stämme nur 18 oder 41,8 % Colikulturen waren.

Alle bei diesen Versuchsreihen isolierten Kulturen wurden bezüglich ihres morphologischen und kulturellen, sowie mit Rücksicht auf die Laubenheimerschen Angaben über die schlechtere Färbbarkeit der auf Dieudonné-Agar gewachsenen Vibrionen auch bezüglich ihres färberischen Verhaltens untersucht. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse enthält Tabelle VIII.

Tabelle VIII.

Verhalten der auf den verschiedenen Nährböden isolierten Kulturen.

Bezeichnung des Stammes	Morphologisches Verhalten	Färbbarkeit	Beweglichkeit	Wachstum auf Agar	Wachstum auf bunten Nährböden
1. E. 1	Kurze, feine, schlanke Stäbchen, gut gekrümmt	gut färbbar	lebhaft beweglich	sehr kleine, zarte, durchscheinende Kolonien	wie Vibrionen
2. E. 2	Kurze, dicke, ziemlich plumpe, gerade Stäbchen	„	gut beweglich	kleine, trübweißliche, flache Kolonien	wächst wie Bac. faec. alcalig.
3. E. 3	Kurze, dicke, plumpe Stäbchen	meist bipolar und mäßig gefärbt	nicht deutlich beweglich	zarte, flache, durchscheinende, zentralgetrübte Kolonien	Bact. coliartiges Verhalten
4. E. 4	Schlanke, dünne, gut gekrümmte, kurze Stäbchen	gut färbbar	lebhaft beweglich (choleraähnlich)	sehr kleine, zarte, durchscheinende, etwas irisierende Kolonien	wie Bac. faec. alcalig.
5. E. 5	Ziemlich plumpe Stäbchen	segmentiert gefärbt	unbeweglich	zieml. große, leicht getrübte, flache Kolonien	Bact. coliartiges Verhalten
6. E. 6	Kurze, dicke, plumpe Stäbchen	gut färbbar	unbeweglich	flache, saftige, undurchsichtige Kolonien	Bact. coliartiges Verhalten
7. E. 7	Sehr kurze, schlanke, dünne, gerade Stäbchen	gut färbbar	nicht deutlich beweglich	„	„
8. E. 8	Sehr kurze, dicke, plumpe Stäbchen	„	„	saftige, undurchsicht., gelbweißliche Kolonien	Bact. coliartiges Verhalten
9. E. 9	„	„	„	„	„
10. E. 10	Dicke, plumpe, ziemlich kurze Stäbchen	„	„	„	„
11. E. 11	Schlanke, dünne, gut gekrümmte Stäbchen v. mittlerer Länge	gut färbbar	lebhaft beweglich (choleraähnlich)	kleine, zarte, durchscheinende Kolonien	wie Bac. faec. alcalig.
12. E. 12	Mittelschlanke, gut gekrümmte Stäbchen	gut färbbar	lebhaft beweglich	sehr kleine, zarte, durchscheinende Kolonien	wie Bac. faec. alcalig.
13. E. 13	Sehr kurze, plumpe kokkenähnl. Stäbchen	„	unbeweglich	saftige, undurchsichtige, gelblichweiße Kolonien	Bact. coliartiges Wachstum
14. E. 14	Kurze, plumpe, zum Teil schwach gekrümmte Stäbchen	gut färbbar	unbeweglich	saftige, undurchsichtige, gelblichweiße Kolonien	Bact. coliartiges Wachstum
15. E. 15	Kurze, mittelschlanke, gerade Stäbchen	„	„	„	„
16. E. 16	Kurze, plumpe, teilweise gekrümmte Stäbchen	„	„	„	„
17. E. 17	Kurze, plumpe, gerade, an den Enden stark abgerundete Stäbchen	„	nicht deutlich beweglich	„	zuerst Rötung u. Trübung, dann Entfärbung der Lackmusmolke, sonst Bact. coliartiges Verhalten

Bezeichnung des Stammes	Morphologisches Verhalten	Färbbarkeit	Beweglichkeit	Wachstum auf Agar	Wachstum auf bunten Nährböden
18. E. 18	Kurze, dicke, plumpe Stäbchen	gut färbbar	unbeweglich	1. helle, durchscheinende 2. trübe, gelbweißliche, undurchsichtige, saftige Kolonien	Alkalisierung d. Milch, zuerst Rötung u. Trübung, dann Entfärbung der Lackmusmolke, sonst Bact. coliartiges Verhalten
19. E. 19	Kurze, dicke, plumpe, zum Teil schwach gekrümmte Stäbchen	„	„	leicht getrübte, saftige, flache Kolonien	Bact. coliartiges Wachstum
20. E. 20	Kurze, dicke, kokkenähnliche Stäbchen	„	„	1. zarte, helle, durchscheinende Kolonien v. kurzen, dicken, schwach gekrümmten Stäbchen 2. große, gelbweise, undurchsichtige Kolonien, die sich aus sehr kurzen, dicken, plumpen Stäbchen zusammensetzen	Bact. coliartiges Wachstum
21. E. 21	Kurze, dicke, plumpe Stäbchen	meist bipolar u. schwach gefärbt	unbeweglich	1. kleine, zarte, durchscheinende u. 2. etwas größere, undurchsichtige, gelbweiße Kolonien, die beide aus kurzen, dicken, plumpen Stäbchen bestehen	„
22. E. 22	Kurze, dicke, zum Teil gekrümmte Stäbchen	gut färbbar	unbeweglich	Große, gelbweiße, undurchsichtige Kolonien	Bact. coliartiges Verhalten
23. E. 23	Kurze, dicke, plumpe Stäbchen	„	„	„	„
24. E. 24	Schlanke, gut gekrümmte Stäbchen von mittlerer Länge	„	lebhaft beweglich	helle, durchscheinende, zarte Kolonien	wie Vibrionen
25. E. 25	Kurze, dicke, plumpe Stäbchen	„	unbeweglich	gelblichweiße, trübe, große Kolonien	Bact. coliartiges Wachstum
26. E. 26	„	„	„	1. helle, durchscheinende 2. gelbweiße, undurchsichtige Kolonien	„
27. E. 27	„	„	„	ziemlich große, gelbweiße, undurchsichtige Kolonien	„
28. E. 28	Zarte, schlanke, kurze, teilw. gut gekrümmte Stäbchen	„	lebhaft beweglich	helle, leicht getrübte, zerfließende Kolonien	wie Bac. proteus
29. E. 29	Kurze, dicke, plumpe Stäbchen	„	unbeweglich	1. helle, durchscheinende 2. gelbweiße, undurchsichtige Kolonien	Bact. coliähnl. Wachstum
30. E. 30	„	„	„	durchscheinende, zentralgetrübte, ziemlich große Kolonien	„
31. E. 31	„	„	„	1. helle, durchscheinende 2. gelbweiße, undurchsichtige Kolonien	„
32. E. 32	„	„	„	„	„

Bezeichnung des Stammes	Morphologisches Verhalten	Färbbarkeit	Beweglichkeit	Wachstum auf Agar	Wachstum auf bunten Nährböden
33. E. 33	Kurze, dicke, plumpe Stäbchen	gut färbbar	unbeweglich	1. helle, durchscheinende 2. gelbweiße, undurchsichtige Kolonien	Bact. coliähnl. Wachstum
34. E. 34	Kurze, schlanke, feine Stäbchen	„	„	helle, leicht getrübte, ziemlich große Kolonien	„
35. E. 35	Kurze, dicke, teilweise schwach gekrümmte Stäbchen	„	„	Gelbweiße, undurchsichtige, ziemlich große Kolonien	„
36. E. 36	Kurze, dicke, plumpe, teilweise schwach gekrümmte Stäbchen	„	„	geriffelte, gelbweise, undurchsichtige, große Kolonien	Bact. coliartiges Verhalten
37. E. 37	Schlanke, schwach gekrümmte, mäßig dicke Stäbchen	„	lebhaft beweglich	äußerst feines, hauchartiges Wachstum	wie Vibrionen
38. E. 38	Kurze, dicke, plumpe Stäbchen	„	unbeweglich	geriffelte, gelbweiße, undurchsichtige, große Kolonien	Bact. coliartiges Wachstum
39. E. 39	„	„	„	„	„
40. E. 40	Zieml. lange, schlanke, zum Teil gekrümmte Stäbchen	„	„	sehr zarte, feine, durchscheinende Kolonien	„
41. E. 41	Kurze, dicke, plumpe Stäbchen	„	„	große, gelbweiße, undurchsichtige Kolonien	vergär. beide nicht Trauben- bezw. Milchzucker, sonst Bact. coliähnliches Wachstum
42. E. 42	Mittellange, gerade, dicke, plumpe Stäbchen	schlecht färbbar	„	„	
43. E. 43	Teils dickere, teils dünnere, kurze Stäbchen	gut färbbar	„	gelbweiße, undurchsichtige, große Kolonien	Bact. coliartiges Verhalten
44. E. 44	Mittellange, schlanke, gut gekrümmte Stäbch.	„	gut beweglich	sehr zarte, irisierende, kleine Kolonien	wie Bac. faec. alcalig.
45. E. 45	Kurze, dicke, plumpe Stäbchen	„	unbeweglich	gelbweißliche, saftige, undurchsicht. Kolonien	Bact. coliartiges Wachstum
46. E. 46	Feine, schlanke, mäßig gekrümmte Stäbchen	„	geringe Beweglichkeit	kleine, zarte, irisierende Kolonien	wie Bac. faec. alcalig.
47. E. 47	Lange, schlanke, stark gekrümmte Stäbchen	„	gut beweglich	flache, helle, durchscheinende Kolonien	wie Vibrionen
48. E. 48	Kurze, dicke, plumpe Stäbchen	„	unbeweglich	1. helle, schwach durchscheinende 2. trübe, gelbweiße, undurchsichtige Kolonien	Bact. coliähnliches Wachstum
49. E. 49	Kurze, dicke, plumpe, teilweise schwach gekrümmte Stäbchen	„	„	große gelblichweiße, undurchsichtige, saftige Kolonien	wie Bact. coli
50. E. 50	Sehr kurze, dicke, plumpe Stäbchen	„	„	kleine, leicht getrübte, flache Kolonien	„
51. E. 51	Mittellange, dünne, schwach gekrümmte Stäbchen	„	lebhaft beweglich	helle, irisierende, zarte Kolonien	wie Bac. faec. alcalig.
52. E. 52	Kurze, mitteldicke, teilweise schwach gekrümmte Stäbchen	„	unbeweglich	trübe, ziemlich große, gelbweißliche Kolonien	Bact. coliartig
53. E. 53	Kurze, dicke, plumpe Stäbchen	„	„	trübe, ziemlich große, gelbweißliche Kolonien	„

Bezeichnung des Stammes	Morphologisches Verhalten	Färbbarkeit	Beweglichkeit	Wachstum auf Agar	Wachstum auf bunten Nährböden
54. D. 1 (= E. 1)	Kurze, feine, schlanke gut gekrümmte Stäbch.	gut färbbar	lebhaft beweglich	sehr kleine, zarte, durchscheinende Kolonien	wie Vibrionen
55. D. 2 (= E. 7)	Mittellange, zarte, schlanke, teilw. schwach gekrümmte Stäbchen	„	unbeweglich	flache, saftige, trübweißliche Kolonien	Bact. coliartig
56. D. 3 (= E. 4)	Kurze, schlanke, gut gekrümmte Stäbchen	„	lebhaft beweglich	sehr kleine, zarte, durchscheinende Kolonien	wie Bac. faec. alcalig.
57. D. 4 (= E. 9)	Sehr kurze, dicke plumpe Stäbchen	„	unbeweglich	saftig., undurchsichtige, gelbweißliche Kolonien	Bact. coliähnliches Verhalten
58. D. 5 (= E. 11)	Zarte, schlanke, gut gekrümmte Stäbchen	„	lebhaft beweglich	kleine, zarte, durchscheinende Kolonien	wie Bac. faec. alcalig
59. D. 6 (= E. 12)	Mittelschlanke, gut gekrümmte Stäcbhen	„	„	sehr kleine, zarte, durchscheinende Kolonien	„
60. D. 7 (= E. 13)	Sehr plumpe, kurze kokkenähnliche Stäbch.	„	unbeweglich	saftig., undurchsichtige, gelbweißliche Kolonien	Bact. coliartiges Wachstum
61. D. 8 (= E. 21)	Sehr kurze, dicke plumpe Stäbchen	„	„	zarte, helle, leicht getrübte Kolonien	„
62. D. 9	Zarte, schlanke, gut gekrümmte Stäbchen	„	lebhaft beweglich	zarte, helle, durchscheinende Kolonien	wie Vibrionen
63. D. 10 (= E. 37)	Mitteldicke, zarte, schwach gekrümmte Stäbchen	„	„	äußerst feines, hauchartiges Wachstum	„
64. D. 11	Dicke, plumpe, kurze milzbrandähnliche Stäbchen	„	unbeweglich	ziemlich große, gelbweißliche, undurchsichtige Kolonien	Bact. coliartiges Verhalten
65. D. 12 (= E. 44)	Mittellange, schlanke gut gekrümmte Stäbchen	teils bipolar, teils segmentiert gefärbt	gut beweglich	sehr zarte, irisierende kleine Kolonien	wie Bac. faec. alcalig.
66. D. 13 (= E. 46)	Kurze, schlanke, gut gekrümmte Stäbchen	gut färbbar	geringe Beweglichkeit	„	„
67. D. 14 (= E. 47)	Lange, schlanke, stark gekrümmte Stäbchen	„	gut beweglich	flache, helle, durchscheinende Kolonien	wie Vibrionen
68. D. 15 (= E. 51)	Kurze, dünne, schwach gekrümmte Stäbchen	„	„	zarte, irisierende, feine Kolonien	wie Bac. faec. alcalig.
69, D. 16 (=K. 4)	Ziemlich lange, schlanke, gut gekrümmte Stäbchen	„	„	„	„
70. D. 17 (= K. 10)	Zarte, schlanke, gut gekrümmte, mittellange Stäbchen	„	„	„	„
71. D. 18 (= K. 11)	Kurze, schlanke gut gekrümmte Stäbchen	„	„	„	„
72. D. 19 (= K. 14)	Mittellange, sehr dünne, gut gekrümmte Stäbchen	„	lebhafte Beweglichkeit	kleine, zarte, durchscheinende Kolonien	wie Vibrionen
73. D. 20	Sehr kurze, mitteldicke gerade Stäbchen	„	„	dichtes, rasenförmiges, zerfließendes Wachstum, durchscheinend	Bac. proteus

Bezeichnung des Stammes	Morphologisches Verhalten	Färbbarkeit	Beweglichkeit	Wachstum auf Agar	Wachstum auf bunten Nährböden
74. D. 21 (= P. 3)	Lange, schlanke, zum Teil gut gekrümmte Stäbchen	teilweise segmentiert gefärbt	lebhafte schlängelnde Bewegung	kleine, zarte, schwach irisierende, durchscheinende Kolonien	wie Bac. faec. alcalig.
75. D. 22	Sehr kurze, dicke, plumpe Stäbchen	gut färbbar	unbeweglich	gelblichweiße, undurchsichtige saftige Kolonien	wie Bact. coli
76. D. 23 (= P. 7)	Sehr kurze, gerade, schlanke Stäbchen	„	lebhaft beweglich	rasenförmiges, zerfließendes Wachst. ohne deutl. Kolonienbildung	Bac. proteus
77. D. 24	Kurze zum Teil gerade zum Teil schwach gekrümmte mitteldicke Stäbchen	„	unbeweglich	mattweiße, undurchsichtige, flache Kolonien	Bact. coliartig
78. D. 25	Mittellange, gerade, plumpe Stäbchen	„	„	milchige, weiße, undurchsichtige saftige Kolonien	„
79. D. 26	Kurze, mäßig dicke, gerade Stäbchen	„	lebhaft beweglich	dichtes, rasenförmiges Wachstum, ohne deutliche Kolonienbildung	Bac. proteus
80. D. 27	Sehr kurze, dicke plumpe Stäbchen	„	unbeweglich	trübweiße, undurchsichtige flache Kolonien	Bact. coliartig
81. D. 28	Kurze, plumpe, gerade Stäbchen	„	„	„	„
82. D. 29	Kurze, dicke, gerade Stäbchen	„	„	gelbweiße, undurchsichtige, saft. Kolonien	„
83. D. 30	Sehr kurze, zieml. dicke gerade Stäbchen	„	„	mattweiße, undurchs., zarte Kolonien	wie Bact. coli
84. D. 31 (= P. 14)	Sehr kurze, mäßig dicke, gerade Stäbchen	„	lebhaft beweglich	dickes, rasenförmiges Wachstum ohne deutliche Kolonienbildung	Bac. proteus
85. D. 32	Kurze, dicke, plumpe Stäbchen	„	„	gelbweiße, saftige, undurchsichtige Kolonien	wie Bact. coli
86. D. 33	Kurze dicke, plumpe, gerade Stäbchen	„	„	„	„
87. D. 34	Verschieden lange, teils gerade, teils schwach gekrümmte Stäbchen	meist segmentiert gefärbt	„	zarte, kleine, stark irisierende (grünlich) Kolonien	wie Bac. faecal. alcalig.
88. D. 35 (= P. 20)	Lange, meist gerade, mitteldicke Stäbchen	gut färbbar	unbeweglich	milchweiße, undurchsichtige, flache Kolonien	wie Bact. coli
89. D. 36 (= P. 21)	Kurze, gerade, schlanke Stäbchen	„	lebhaft beweglich	dickes, rasenförmiges Wachstum ohne deutliche Kolonienbildung	Bac. proteus
90. D. 37 (= P. 22)	Kurze, plumpe, gerade Stäbchen	„	unbeweglich	gelbweiße, undurchsichtig., saftig. Kolonien	wie Bact. coli
91. D. 38 (= P. 25)	„	„	„	„	„
92. D. 39 (= P. 26)	Sehr kurze, dicke, plumpe Stäbchen	„	„	„	„
93. D. 40 (= P. 36)	Verschieden lange, meist schw. gekrümmt., schlanke Stäbchen	„	lebhafte schlängelnde Bewegung	kleine, zarte, stark irisierende (grünlich) Kolonien	wie Bac. faecal. alcalig.

Bezeichnung des Stammes	Morphologisches Verhalten	Färbbarkeit	Beweglichkeit	Wachstum auf Agar	Wachstum auf bunten Nährböden
94. D. 41 (= P. 39)	Kurze, dicke, plumpe, kokkenähnl. Stäbchen	gut färbbar	unbeweglich	Sehr feine, zarte, schwach durchscheinende Kolonien	wie Bact. coli
95. D. 42 (= P. 42)	Kurze, gerade, schlanke Stäbchen	„	lebhaft beweglich	Dickes, rasenförmiges Wachstum ohne deutliche Kolonienbildung	wie Bac. proteus
96. D. 43 (= P. 45)	„	„	„	„	„
97. K. 1	Kurze, dicke, plumpe Stäbchen	gut färbbar	unbeweglich	trübe, gelbweiße, ziemlich große Kolonien	Bact. coliartiges Verhalten
98. K. 2	Kurze, dicke, ziemlich plumpe Stäbchen	„	„	flache, leichtgetrübte, gelbweißliche, ziemlich große Kolonien	„
99. K. 3	Ziemlich lange, schlanke, gut gekrümmte Stäbchen	schlecht färbbar	sehr lebhaft beweglich	kleine, zarte, homogene durchschein. Kolonien	wie Vibrionen
100. K. 4 (= D. 16)	„	gut färbbar	gut beweglich	kleine, zarte, durchscheinende, irisierende Kolonien	wie Bac. faec alcalig.
101. K. 5	Sehr kurze, dicke, plumpe, kokkenähnl. Stäbchen	meist bipolar gefärbt	unbeweglich	gelbweiße, große undurchsichtige Kolonien	Bact. coliartiges Wachstum
102. K. 6	Schlanke, dünne, teilweise schwach gekrümmte Stäbchen	gut färbbar	„	helle mattweißliche, zentral stärker getrübte, zieml. große Kolonien	„
103. K. 7	Kurze, plumpe, dicke Stäbchen	„	„	1. helle, mattweißliche, schwach durchschein.	Bact. coliartiges Wachstum
		„	„	2. trübe, undurchsichtige, gelbweiße Kolonien, beide aus kurzen, dicken, plumpen Stäbchen bestehend	
104. K. 8	Mittellange, schlanke, gut gekrümmte Stäbchen	„	lebhaft beweglich	zarte, helle, durchscheinende, irisierende Kolonien	wie Bac. faec. alcalig.
105. K. 9	Kurze, dicke, plumpe, teilweise leicht gekrümmte Stäbchen	„	unbeweglich	trübweißliche, undurchsichtige, ziemlich große Kolonien	Bact. coliartiges Wachstum
106. K. 10 (= D. 17)	Zarte, schlanke, mittellange, gut gekrümmte Stäbchen	„	gut beweglich	zarte, durchscheinende, irisierende Kolonien	wie Bac. faec. alcalig.
107. K. 11 (= D 18)	Kurze, schlanke, gut gekrümmte Stäbchen	„	„	„	„
108. K. 12	Kurze dicke, schwach gekrümmte Stäbchen	„	unbeweglich	große, gelbe, undurchsichtige Kolonien	Bact. coliartiges Wachstum
109. K. 13	Sehr kurze, gerade Stäbchen von mittlerer Dicke	„	„	ziemlich große, leicht getrübte Kolonien	„
110. K. 14 (= D. 19)	Zieml. kurze, schlanke, gut gekrümmte Stäbch.	„	geringe Beweglichkeit	kleine, zarte, durchscheinende Kolonien	wie Vibrionen
111. P. 1	Sehr kurze, mitteldicke, gerade Stäbchen	gut färbbar	lebhaft beweglich	helle, leicht getrübte, zarte, kleine Kolonien	wie Paratyphus B.

Bezeichnung des Stammes	Morphologisches Verhalten	Färbbarkeit	Beweglichkeit	Wachstum auf Agar	Wachstum auf bunten Nährböden
112. P. 2	Kurze, dicke, plumpe Stäbchen	gut färbbar	unbeweglich	1. helle, durchscheinende Kolonien 2. gelbweiße, saftige undurchsichtige Kolonien	wie Bact. coli
113. P. 3 (= D. 21)	Lange, schlanke, meist schwach gekrümmte Stäbchen	teilweise segmentiert gefärbt	lebhafte, schlängelnde Bewegungen	kleine, zarte, schwach irisierende, durchscheinende Kolonien	wie Bac. faec. alcalig.
114. P. 4	Verschieden lange, dicke, gerade Stäbchen	gut färbbar	unbeweglich	1. helle, durchschein. 2. gelbweiße, saftige, undurchsichtige Kolonien	wie Bact. coli
115. P. 5	Sehr kurze, mitteldicke Stäbchen	„	„	mattweiße, undurchsichtige, flache Kolonien	„
116. P. 6	„	„	„	„	„
117. P. 7 (= D. 23)	Sehr kurze, gerade, schlanke Stäbchen	„	lebhaft beweglich	dickes, rasenförmiges Wachstum, ohne deutliche Kolonienbildung	Bac. proteus
118. P. 8 (= D. 24)	Teils längere, schlanke, gerade, teils kürzere, dicke, plumpe Stäbchen	„	unbeweglich	1. helle, matt durchscheinende 2. gelblichweiße, undurchsichtige, saftige Kolonien	wie Bact. coli
119. P. 9 (= D. 25)	„	„	„	„	„
120. P. 10 (= D. 26)	Kurze, mäßig dicke, gerade Stäbchen	„	lebhaft beweglich	dickes, rasenförmiges Wachstum, ohne deutliche Kolonienbildung	Bac. proteus
121. P. 11 (= D. 27)	Sehr kurze, dicke, plumpe Stäbchen	„	unbeweglich	1. helle, matt durchscheinende zartere 2. gelbweiße, undurchsichtige saftige Kolonien	wie Bact. coli
122. P. 12	Sehr kurze, mitteldicke, gerade Stäbchen	„	lebhaft beweglich	dickes, rasenförmiges Wachstum, ohne deutliche Kolonienbildung	Bac. proteus
123. P. 13 (= D. 29)	Kurze, dicke, gerade Stäbchen	„	unbeweglich	gelbweiße, undurchsichtige, saftige Kolonien	wie Bact. coli
124. P. 14 (= D. 31)	Kurze, gerade, mäßig dicke Stäbchen	„	lebhaft beweglich	dickes, rasenförmiges Wachstum ohne deutliche Kolonienbildung	Bac. proteus
125. P. 15	Teils längere, schlanke, teils kürzere, dicke, plumpe Stäbchen	„	unbeweglich	1. helle, mattdurchscheinende, zarte 2. gelbweiße, undurchsichtige, saftige Kolonien	wie Bact. coli
126. P. 16 (= D. 32)	Sehr kurze, dicke, plumpe Stäbchen, kokkenähnlich	„	unbeweglich	gelbweiße, undurchsichtige Kolonien	wie Bact. coli
127. P. 17	Teils sehr kurze, teils längere, dicke, gerade Stäbchen	„	langsame, schlängelnde Bewegungen	trübe, weißbläuliche, zarte Kolonien	„

Bezeichnung des Stammes	Morphologisches Verhalten	Färbbarkeit	Beweglichkeit	Wachstum auf Agar	Wachstum auf bunten Nährböden
128. P. 18	Kurze, dicke, plumpe Stäbchen	gut färbbar	unbeweglich	gelblichweiße, undurchsicht., saftige Kolonien	wie Bact. coli
129. P. 19	Kurze, mäßig dicke, gerade Stäbchen	„	„	helle, mattweiße, trübe, flache Kolonien	„
130. P. 20 (= D. 35)	Lange, mitteldicke Stäbchen	„	„	„	„
131. P. 21 (= D. 36)	Kurze, gerade, schlanke Stäbchen	„	lebhaft beweglich	dickes, rasenförmiges Wachstum ohne deutliche Kolonienbildung	Bac. proteus
132. P. 22 (= D. 37)	Teils sehr kurze, dicke, kokkenähnliche, teils längere, mitteldicke, gerade Stäbchen	„	unbeweglich	1. hellere, matt durchscheinende, zarte, 2. gelbweiße, undurchsicht., saftige Kolonien	wie Bact. coli
133. P. 23	Sehr kurze, dicke, plumpe Stäbchen	„	„	gelbweiße, etwas irisierende, undurchsichtige Kolonien	„
134. P. 24	Kurze, mitteldicke, gerade Stäbchen	„	„	„	„
135. P. 25	Kurze, dicke, plumpe, gerade Stäbchen	„	„	gelbweiße, undurchsichtige, saftige Kolonien	„
136. P. 26 (= D. 39)	Teils kurze, plumpe, teils längere, schlanke, gerade Stäbchen	„	„	1. hellere, matt durchscheinende, zarte, 2. gelbweiße, undurchsicht., saftige Kolonien	„
137. P. 27	Lange, meist schwach gekrümmte, zu Fadenbildung neigende, schlanke Stäbchen	meist segmentiert gefärbt	lebhaft beweglich	kleine, zarte, schwach irisierende, durchscheinende Kolonien	wie Bac. faec. alcalig.
138. P. 28	Kurze, dicke, gerade Stäbchen	gut färbbar	unbeweglich	milchweiße, trübe, flache Kolonien	wie Bact. coli
139. P. 29	„	„	„	„	„
140. P. 30	Kurze, schlanke, gerade Stäbchen	„	„	gelblichweiße, undurchsicht., saftige Kolonien	„
141. P. 31	Kurze, dicke, plumpe Stäbchen	„	„	„	„
142. P. 32	Kurze, mitteldicke, gerade Stäbchen	„	„	milchigweiße, undurchsicht., flache Kolonien	„
143. P. 33	Kurze, schlanke, gerade, Stäbchen	„	lebhaft beweglich	dickes, rasenförmiges Wachstum ohne deutliche Kolonienbildung	Bac. proteus
144. P. 34	Teils kurze, dicke, plumpe, teils lange, schlanke Stäbchen	„	unbeweglich	1. hellweiße, undurchsichtige, saftige, 2. helle, matt durchscheinende, zarte Kolonien	wie Bact. coli
145. P. 35	Kurze, mitteldicke, plumpe Stäbchen	„	„	gelbweiße, etwas irisierende, saftige Kolonien	„
146. P. 36 (= D. 40)	Verschieden lange, schlanke, meist schwach gekrümmte Stäbchen	„	lebhafte, schlängelnde Bewegungen	kleine, zarte, stark irisierende (grünlich) Kolonien	wie Bac. faec. alcalig.
147. P. 37	Teils lange, schlanke, gerade, teils kurze, dicke, plumpe Stäbchen	„	unbeweglich	1. helle, matt durchscheinende, zarte, 2. gelbweiße, undurchsichtige Kolonien	wie Bact. coli

Bezeichnung des Stammes	Morphologisches Verhalten	Färbbarkeit	Beweglichkeit	Wachstum auf Agar	Wachstum auf bunten Nährböden
148. P. 38	Teils lange, schlanke, gerade, teils kurze, dicke, plumpe Stäbchen	gut färbbar	unbeweglich	1. helle, matt durchscheinende, zarte, 2. gelbweiße, undurchsichtige Kolonien	wie Bact. coli
149. P. 39 (= D. 41)	Sehr kurze, dicke, plumpe Stäbchen	„	„	sehr feine, zarte, schwach durchscheinende Kolonien	„
150. P. 40	Teils sehr kurze, dicke, plumpe, kokkenähnliche, teils kurze, mitteldicke, gerade Stäbchen	„	„	1. gelbweiße, saftige, schwach irisierende, 2. helle, mattweiße, flache Kolonien	„
151. P. 41	Teils sehr kurze, dicke, plumpe, teils kurze, schlanke, gerade Stäbchen	„	lebhaft beweglich	1. trübe, gelbweiße, saftige, 2. helle, matt durchscheinende, flache Kolonien	wie Paratyph. B.
152. P. 42 (= D. 42)	Kurze, gerade, schlanke Stäbchen	„	„	dickes, rasenförmiges Wachstum ohne deutliche Kolonienbildung	Bac. proteus
153. P. 43	Teils sehr kurze, dicke, plumpe, teils kurze, schlanke, gerade Stäbchen	„	unbeweglich	1. gelbweiße, undurchsichtige, saftige 2. helle, matt durchscheinende, flache Kolonien	wie Bact. coli
154. P. 44	„	„	„	„	„
155. P. 45 (= D 43)	Kurze, mitteldicke, gerade Stäbchen	„	lebhaft beweglich	dickes rasenförmiges Wachstum, ohne deutliche Kolonienbildung	Bac. proteus
156. P. 46	Lange schlanke, meist schwach gekrümmte Stäbchen	meist segmentiert gefärbt	lebhaft schläng. Beweg.	kleine, zarte, durchscheinende, grünlich irisierende Kolonien	wie Bac. faec. alcalig.
157. P. 47	Verschieden lange, schlanke, schwach gekrümmte Stäbchen	„	„	„	„
158. P. 48	Sehr kurze, dicke, plumpe Stäbchen	gut färbbar	unbeweglich	gelbweiße, saftige, undurchsichtige Kolonien	wie Bact. coli
159. N. 1 (= D. 3, E. 4)	Zarte, schlanke, gut gekrümmte, kurze Stäbchen	gut färbbar	lebhaft beweglich	sehr kleine, zarte, durchscheinende, etwas irisierende Kolonien	wie Bac. faec. alcalig.
160. N. 2 (= D. 9)	„	„	„	zarte, helle, durchscheinende Kolonien	wie Vibrionen
161. N. 3 (= D. 12, E. 44)	Mittellange, schlanke, meist schwach gekrümmte Stäbchen	teils bipolar, teils segment. gefärbt	„	sehr zarte, kleine, irisierende Kolnnien	wie Bac. faec. alcalig.
162. N. 4 (= D. 13, E. 46)	Kurze, schlanke, meist gutgekrümmte Stäbchen	gut färbbar	geringe Beweglichkeit	„	„

Auf den Elektivnährböden zeigten die betreffenden Stämme, wenn auch einzelne hinsichtlich Kolonienform und Färbung der Kolonien stärkere oder schwächere Abweichungen von dem Aussehen der Cholerakolonien aufwiesen, im allgemeinen doch ein derartiges Wachstum, daß eine sichere Differenzierung von echter Cholera nicht möglich gewesen wäre. Die Entwicklung der Coli-Kolonien und der des Bacillus Proteus war meist geringer wie die der Vibrionen und des Bacillus Alkaligenes. Die beiden letzteren Bakterienarten zeigten mitunter auf den Elektivnährböden aber auch ein ebenso reichliches, rasenartiges Wachstum wie es bei Cholera zu beobachten ist.

Die Tatsache, daß in diesen Versuchsreihen mit Hilfe der geprüften Nährböden aus 109 Stuhlproben 12mal = in 11 % Vibrionenkulturen isoliert werden konnten, erscheint insofern von besonderer Bedeutung, als sie zeigt, daß choleraähnliche Vibrionen anscheinend im menschlichen Darm doch häufiger vorkommen können, als man früher im allgemeinen anzunehmen geneigt war. Wenn früher ein derartiger Nachweis der Vibrionen nur ausnahmsweise gelang, so war dies wohl darin begründet, daß auf den zu den Stuhluntersuchungen früher verwandten Nährböden die Vibrionen überhaupt nicht zum Wachstum kamen oder von den anderen Darmbakterien überwuchert wurden und deshalb sich dem Nachweis entzogen, während sie jetzt auf den Elektivnährböden besser zur Entwicklung kommen können.

Von Bürgers, sowie von Sparmberg und Bernhardt (10) liegen ebenfalls Mitteilungen vor über den Nachweis von choleraähnlichen Vibrionen aus menschlichem Stuhl mit Hilfe der Choleraelektivnährböden. Man darf dabei allerdings nicht außer acht lassen, daß, worauf schon Pergola sowie Glaser und Hachla hinwiesen, zum Teil auch andere Keime die Neigung haben auf den Choleraelektivnährböden in vibrionenartigen, gekrümmten Formen zu wachsen. Dies gilt namentlich für Stämme der Alkaligenesgruppe. Man wird daher eine auf den Choleraelektivnährböden vibrionenartige Formen zeigende Kultur nicht ohne weiteres als Vibrionenstamm ansehen können, sondern wird außerdem auch das allgemeine kulturelle und das sonstige morphologische Verhalten des betreffenden Stammes in Rücksicht ziehen müssen. Von Bärthlein (11) ist über die in dieser Hinsicht gelegentlich der vorliegenden Untersuchungen gemachten Beobachtungen schon an anderer Stelle berichtet und ausführlich hervorgehoben worden, in welcher Weise sich bezgl. des morphologischen und kulturellen Verhaltens die hier hauptsächlich in Frage kommenden Stämme der Alkaligenesgruppe von den Vibrionenstämmen unterscheiden lassen. Auch von Pollak (12) sind entsprechende Beobachtungen mitgeteilt worden. Hier sei deshalb nur kurz auf die Differenzen in dem kulturellen Verhalten der beiden Bakterienarten hingewiesen.

Auf den für die Typhusdiagnose gebräuchlichen Nährböden wächst der Bac. faecal. alkalig., wie bekannt, in der Weise, daß er die Lackmusmolke unter gleichzeitiger Trübung stets tiefblau färbt, die Milch stark alkalisch macht und aufhellt, in den Milchzucker- bezw. Traubenzuckerbouillon - Gärungsröhrchen kommt es nur im offenen Schenkel zum Wachstum unter Trübung der Nährflüssigkeit, aber ohne Gasbildung. Die Lackmusnutrose - Zuckerlösung I und II nach Barsiekow, sowie die

Lackmus-Mannit-Nutroselösung von Hetsch, läßt er, abgesehen von einer geringen Steigerung ihrer Blaufärbung, unverändert. Von den Malachitgrünlösungen I und II nach Löffler wird durch Alkaligenes der Nährboden I entweder stark entfärbt, so daß ein schwachbräunlicher Farbenton entsteht, oder er bleibt oftmals unverändert, ebenso wie Löfflerlösung II, die jedoch ab und zu auch eine mäßige Aufhellung zeigen kann. Endlich wird der Neutralrotagar im oberen Teil safranartig verfärbt. Dagegen zeigen die bei diesen Untersuchungen isolierten, wie auch alle andern geprüften Vibrionen auf den genannten Nährsubstraten ein anderes Verhalten. Hier trifft man bei der Milch eine stark saure Reaktion, meist verbunden mit kräftiger Koagulation, die Nährlösungen Barsiekow I und Hetsch zeigen infolge der Säurebildung eine beträchtliche Rötung unter mehr oder weniger starker Trübung, an deren Stelle häufig direkte Ausfällung tritt. Barsiekow II wird von einem Teil der Vibrionen mehr oder weniger stark, häufig sogar komplett aufgehellt, von einem anderen Teil mehr oder weniger intensiv gerötet, wobei diese Rötung in vielen Fällen nur der totalen Entfärbung vorausgeht. Die Lackmusmolke zeigt bei den Vibrionen auch verschiedentlich eine geringe Blaufärbung bis Violettfärbung, indessen tritt später gewöhnlich ein Umschlag in Rotfärbung bezw. eine totale Aufhellung ein. In den Gärungsröhrchen von Traubenzucker- bezw. Milchzuckerbouillon zeigen die Stämme im Gegensatz zu Alkaligenes in beiden Schenkeln gleichmäßige Trübung, ebenfalls ohne Gasbildung. Die Stichkultur von Neutralrotagar bleibt vollkommen unverändert. Die beiden Löfflerschen Malachitgrünlösungen zeigen bei den Vibrionen entweder ebenfalls keinen besondereren Reaktionsausschlag oder Löffler I wird im Gegensatz zu dem Verhalten von Alkaligenes durch die Kommabazillen stark getrübt, bezw. koaguliert, während Löffler II häufig unter gleichzeitiger Trübung und starker Häutchenbildung komplett aufgehellt wird. Um klare Resultate zu erhalten ist eine mindestens 8tägige Beobachtung dieser Nährböden angezeigt, besonders in den Fällen, wo die Reaktion erst verspätet und langsam sich einstellt. Dies ist dann zu erwarten, wenn die Vibrionen auf den gewöhnlichen Nährböden ein spärliches Wachstum zeigen. Unter den isolierten Vibrionenkulturen finden sich z. B. Stämme, die auf der gewöhnlichen Agarplatte innerhalb 24 Stunden nur hauchartig wachsen und erst nach 72 Stunden deutliche, kräftige Kolonien erkennen lassen.

Was nun das serologische Verhalten der isolierten Vibrionenstämme anlangt, so ergaben die nach dieser Richtung ausgeführten Untersuchungen, daß es sich bei den geprüften Vibrionen jeweils um selbständige Stämme handelte, die in serologischer Hinsicht keinerlei Beziehungen oder engere Verwandtschaft untereinander erkennen ließen.

Hervorzuheben ist es ferner, daß sämtliche bei diesen Untersuchungen gewonnenen 12 Vibrionenstämme aus Stuhlproben herausgezüchtet wurden, welche von darmkranken Menschen stammten. Dieser auffallende Befund ließ unwillkürlich daran denken, daß das Vorkommen der Vibrionen im Stuhl mit den pathologischen Vorgängen im Darm in Beziehung und in manchen Fällen vielleicht mit dem Krankheitsprozeß selbst in ursächlicher Verbindung stehe. Es wurde aus diesem Grunde auch das Blut einer Anzahl darmkranker Personen auf Vibrionen untersucht, wobei

in einem Falle auch die Isolierung von Vibrionen auf Peptonwasser und auf Blutagar gelang. Leider konnten wir den Fall nicht weiter verfolgen, so daß wir uns auf die Mitteilung der Tatsache beschränken müssen und weitere Schlüsse nicht ziehen können. Besonders erwähnt sei aber, daß auch alle bei den Untersuchungen gefundenen Stämme des Bac. Proteus und ebenso die weitaus überwiegende Mehrzahl der Alkaligeneskulturen aus den Stühlen von darmkranken Personen stammten. Zweimal gelang es uns auch Alkaligenes im Blute solcher Personen mittels Peptonwasser und Blutagar nachzuweisen, ohne daß es uns allerdings möglich gewesen wäre, diese Bakterienbefunde mit dem Krankheitsprozeß in ätiologischen Zusammenhang zu bringen. Jedenfalls geht aber aus unseren Beobachtungen hervor, daß bei pathologischen Vorgängen im Darm sowohl Vibrionen- wie Alkaligenesstämme und auch der Bacillus Proteus sich häufiger aus den Stühlen isolieren lassen, als bei Untersuchung normaler Stuhlproben. Es erscheint daher auch nicht gleichgültig, ob man nur Stühle gesunder Menschen oder auch solche von darmkranken Personen zu derartigen Prüfungsuntersuchungen von Nährböden verwendet, da die Art der zu der Prüfung benutzten Stuhlproben auf die Ergebnisse der Versuche offenbar von wesentlichem Einfluß sein kann. Wir haben deshalb absichtlich eine große Zahl von Stühlen darmkranker Personen zu unseren Versuchen benutzt und halten dieses Verfahren zu allen derartigen Untersuchungen für empfehlenswert.

Zusammenfassend ergibt sich aus den 3 über die entwicklungshemmende Eigenschaft der geprüften Choleraelektivnährböden auf Stuhlbakterien ausgeführten Versuchsreihen, daß die Entwicklung dieser Bakterien insbesondere, der der Coligruppe zugehörigen Bakterien durch den Nährboden nach Neufeld-Woithe und den Dieudonnéschen Originalagar am besten zurückgehalten wird, daß dies etwas weniger der Fall ist seitens des in getrockneter Form aufbewahrten Dieudonnéschen Agars, während von dem Pilonschen Nährboden eine noch geringere und von dem Nährboden nach Esch die schwächste Wirkung in dieser Hinsicht ausgeübt wird.

III.

Die weiteren Versuchsreihen sollten Aufklärung bringen, wie sich die einzelnen Nährböden bewähren in solchen Fällen, wenn die Choleravibrionen in Stuhlgemischen mit den Stuhlbakterien in Wettbewerb treten.

Zu diesem Zwecke wurden 35 Stuhlproben, denen nur spärliche Mengen von Cholerakeimen zugesetzt waren, auf den einzelnen Nährböden vergleichsweise untersucht.

In jedem Falle waren 1 ccm Stuhl 1/100 Öse Choleravibrionen zugemischt und jeweils 2 Ösen des Gemisches auf einer Platte ausgestrichen worden. Das Choleramaterial stammte bei den einzelnen Versuchen nicht immer von demselben Stamme, sondern es waren abwechselnd verschiedene Cholerakulturen benutzt worden.

Wie gleich bemerkt sei, gelang trotz der Beimischung nur einer so geringen Menge von Choleramaterial zu den Stuhlproben in jedem einzelnen Falle auf allen geprüften Nährböden der Choleranachweis ohne Schwierigkeit, da die Choleravibrionen die anderen Stuhlbakterien jeweils überwuchert hatten.

Trotzdem machten sich auch bei diesen Versuchsreihen Unterschiede zwischen den einzelnen Nährböden bemerkbar. Am besten hatte sich regelmäßig die Cholera auf dem Dieudonnéschen Originalagar und auf dem in getrockneter Form aufbewahrten Blutalkaliagar entwickelt. Auf dem Nährboden von Neufeld-Woithe war die Entwicklung der Choleravibrionen meist etwas schwächer, in vereinzelten Fällen sogar nur gering, dafür trat auf ihm, wie dies nach dem Ergebnis der früheren Versuchsreihen zu erwarten war, aber auch die Entwicklung anderer Bakterien so gut wie vollständig zurück, sodaß doch auch mit dieser Modifikation der Choleranachweis regelmäßig gelang.

Auf dem Nährboden nach Pilon und besonders auf dem nach Esch machte sich das Aufkommen auch anderer Stuhlbakterien wieder stärker bemerkbar, trotzdem überwog aber auch hier die Entwicklung der Choleravibrionen regelmäßig, so daß schon mittels der orientierenden Agglutination Cholera auf den Platten doch in jedem Falle festzustellen war. Auf den beiden letztgenannten Nährböden waren aber selbst einzeln stehende Cholerakolonien meist stark mit anderen Bakterien gemischt, sodaß bei den Weiterimpfungen sich die abgeimpften Agarkulturen fast regelmäßig stark verunreinigt erwiesen. Die stärkere Entwicklung auch der anderen Stuhlbakterien auf diesen Modifikationen gab Veranlassung, die verschiedenen Nährböden in weiteren Versuchsreihen im Vergleich zu dem Dieudonnéschen Originalagar noch besonders zu prüfen bezüglich ihres Verhaltens gegenüber Gemischen von Cholera und choleraähnlichen Vibrionen-Reinkulturen sowie gegenüber von Stuhlproben, denen außer Cholera teils andere Vibrionen teils Alkaligenes und Proteus, in einzelnen Fällen auch Typhus, Paratyphus oder Gärtnerbakterien beigemengt waren.

Es erschien nämlich nicht ausgeschlossen, daß bei gleichzeitigem Vorhandensein von Cholera und choleraähnlichen Vibrionen oder anderen auf den Elektivnährböden entwicklungsfähigen Keimen in demselben Stuhl, in einem oder dem anderen Falle doch eine Überwucherung der Cholera durch derartige Bakterien stattfinden könnte.

Zur Heranziehung pathogener Keime, wie Typhus, Paratyphus und Bac. enteritidis Gärtner waren wir durch die oben erwähnte Beobachtung veranlaßt worden, daß auf dem Pilonschen Nährboden auch 2 Paratyphusstämme zu reichlicher Entwicklung gekommen waren. Wir prüften zunächst die Entwicklungsfähigkeit einiger dieser Bakterienarten auf dem Dieudonnéschen Originalagar und auf dem Pilonschen Nährboden.

Mit Typhus haben wir allerdings nur 4 Versuche angestellt, da bei Typhus bei der geringen Alkalitoleranz der Typhusbakterien ein positives Ergebnis von vornherein kaum zu erwarten war.

Bezüglich der Technik sei bemerkt, daß wir in diesen wie in den folgenden Versuchen jeweils eine Öse einer Bakterienaufschwemmung von 1 Öse auf 50 ccm Kochsalzlösung mit 3 Ösen Stuhl mischten und das Gemisch zu den Plattenausstrichen benutzten.

Tabelle IX.

Ausstriche verschiedener mit Typhus infizierter Stuhlproben.

Bezeichnung der Kultur	gemischt mit	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Pilon modifizierten Nährboden
1. Typhus Stolzenburg	Stuhl	Spärliches Wachstum äußerst feiner, zarter durchscheinender Kolonien von Staphylokokken.	1. Reichliches Wachstum von hellen choleraähnlichen, zentral milchig getrübten, glänzenden Kolonien, die aus Stäbchen der Bact. coligruppe bestehen. 2. Vereinzelte, gelbweiße, feine Kolonien von ziemlich großen Kokken.
2. Typhus Gläwe		Steril.	„
3. Typhus 234		1. Vereinz., größere, rauchbraune, durchscheinende Kolonien von Bact. coli. 2. Vereinzelte, äußerst feine, durchscheinende, zarte Kolonien von Staphylokokken.	Wie auf Dieudonné-Agar
4. Typhus 194		Steril.	Vereinzelte, zarte, durchscheinende Kolonien von Diplokokken.

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist wurde in allen diesen 4 Fällen das Typhuswachstum auf den Elektivnährböden völlig unterdrückt.

Zu anderen Ergebnissen führten die mit 5 Paratyphus B-Stämmen und 9 Gaertnerkulturen ausgeführten Versuche (s. Tabelle X, S. 398).

Es ergab sich sonach, daß von den 5 Paratyphus B-Stämmen 2 und von den 9 Gaertnerkulturen 5 Stämme trotz der verhältnismäßig geringen Menge des verimpften Kulturmaterials auf dem einen oder beiden zu dieser Versuchsreihe benutzten Elektivnährböden zur Entwicklung kamen. Bemerkenswert ist es, daß von den zwei auf den Elektivnährböden zur Entwicklung gekommenen Paratyphus B-Stämmen, auf der Pilonschen Modifikation beide reichliches und choleraähnliches Wachstum zeigten, während auf dem Dieudonnéschen Originalagar dies nur bei der einen Kultur Parat. Kozuschek der Fall war, da hier der Paratyphus Lange nur ein kümmerliches, kokkenähnliches Wachstum darbot, das ohne weiteres von dem von Cholera zu unterscheiden war.

Die Gaertnerkulturen verhielten sich auf dem Dieudonnéschen Originalagar und auf dem Pilonschen Nährboden verschieden, auf dem letzteren wuchsen nur die beiden Mutationsstämme des Bac. enteritidis Moorseele, während auf dem ersteren nur der helle Mutationsstamm dieser Kultur, außerdem aber auch noch 3 andere Gaertnerstämme zur Entwicklung kamen. Es zeigte jedoch bei diesen Versuchen nur der Moorseelestamm auf beiden Nährböden ein choleraähnliches Wachstum, während die übrigen Stämme zum Teil zwar reichlich aber in kokkenähnlichen Kolonien wuchsen.

Tabelle X. Ausstriche verschiedener mit Paratyphus B oder Bac. Gaertner infizierter Stuhlproben.

Bezeichnung der Kultur	gemischt mit	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Pilon modifizierten Nährboden
1. Paratyphus B Hellwig	Stuhl	Vereinzelte, äußerst feine, durchscheinende Kolonien von Staphylokokken.	Wie auf Dieudonné Agar.
2. Paratyphus B 217		„	1. Vereinzelte, gelbgraue, feinste Kolonien von Diplokokken. 2. Vereinzelte sehr zarte, durchschein. Kolonien von Staphylokokken.
3. Paratyphus B Kozuschek		Üppiges, rasenförmiges Wachstum von choleraähnlichen, rauchbraunen, durchscheinenden Kolonien, die durch Paratyphus B-Serum stets positiv beeinflußt werden.	Sehr reichliche Entwicklung von hellgrauen, zentral milchig getrübten, glänzenden, choleraähnlichen Kolonien. Agglutin. mit Paratyphus B-Serum stets positiv.
4. Paratyphus B Lange		Spärliches Wachstum sehr feiner, durchscheinender kokkenähnlicher Kolonien. Agglut. mit Paratyphus B-Serum stets positiv.	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von hellen, glänzenden, zentral milchig getrübten, ziemlich großen, choleraähnlichen Kolonien. Agglut. mit Paratyphus B-Serum stets positiv.
5. Paratyphus B Solms		1. Vereinzelte, mittelgroße, durchscheinende, rauchbraune, Kolonien, die sich aus Stäbchen der Bact. Coligruppe zusammensetzen. 2. Vereinzelte, äußerst feine, zarte, durchscheinende Kolonien von Staphylokokken.	Wie auf Dieudonné-Agar; die Bact. coli-Kolonien sind jedoch mehr hellgrau und trüber.
1. Bac. enter. Gaertner Wurmser		Vereinzelte, sehr feine, durchscheinende, zarte Kolonien von Staphylokokken.	Wie Dieudonné-Agar.
2. Bac. enter. Gaertner Täschler		Steril.	Vereinzelte sehr feine, zarte, durchscheinende Kolonien von Staphylokokken.
3. Bac. enter. Gaertner K. G. A.		Steril.	„
4. Bac. enter. Gaertner 710 (Schwein)		Sehr reichliches Wachstum feinster, zärter, durchscheinender, rasenförmig angeordneter Kolonien. Agglut. mit Gaertnerserum stets positiv.	Steril.
5. Bac. enter. Gaertner 603 (Schwein)		Üppiges, rasenförmiges Wachstum sehr feiner, zarter, rauchbrauner durchscheinender Kolonien, die durch Gaertnerserum stets positiv beeinflußt werden.	Vereinzelte sehr feine, durchscheinende Kolonien von Staphylokokken.

Bezeichnung der Kultur	gemischt mit	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Pilon modifizierten Nährboden
6. Bac. enter. Gaertner Darm (Schwein)	Stuhl	Üppiges, rasenförmiges Wachstum sehr feiner, zarter, rauchbrauner durchscheinender Kolonien, die durch Gaertnerserum stets positiv beeinflußt werden.	Vereinzelte, sehr feine, durchscheinende Kolonien von Staphylokokken.
7. Bac. enter. Gaertner Moorseele (helle Kolonienart)		Reichliche Entwicklung von hellen, zarten, choleraähnlichen, rauchbraunen Kolonien. Aggl. mit Gaertnerserum stets positiv.	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von hellen, zentral milchig getrübten, glänzenden, choleraähnlichen Kolonien, die durch Gaertnerserum stets positiv beeinflußt werden.
9. Bac. enter. Gaertner Moorseele (trübe Kolonienart)		Steril.	„

Die nächste Versuchsreihe wurde nun in der Weise ausgeführt, daß von den auf den Elektivnährböden gewachsenen Gaertner- und Paratyphus B-Stämmen wieder in derselben Weise eine Kultur-Stuhlmischung hergestellt und dieser Mischung außerdem noch eine Öse einer Choleraufschwemmung von einer Öse auf 50 ccm Kochsalzlösung zugemengt wurde. Mit diesem Bakterien-Stuhlgemisch wurden jeweils wieder Platten der auch zu den vorigen Versuchen benützten Elektivnährböden beimpft.

Tabelle XI.

Ausstriche verschiedener mit Cholera und Paratyphus, bezw. mit Cholera und Bac. ent. Gaertner infizierter Stuhlproben.

Bezeichnung der Kultur	gemischt mit	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Pilon modifizierten Nährboden
1. Paratyphus B Lange	Stuhl und Cholera 6	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von zarten, durchscheinenden, rauchbraunen Kolonien, Agglut. mit Choleraserum stets positiv	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von ziemlich großen, weißlichgrauen, glänzenden, choleraähnlichen Kolonien, die durch Choleraserum stets positiv beeinflußt werden.
2. Paratyphus B Busse		„	„

Bezeichnung der Kultur	gemischt mit	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Pilon modifizierten Nährboden
3. Bac. enter. Gaertner 710 (Schwein)	Stuhl und Cholera 6	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von zarten, durchscheinenden, rauchbraunen Kolonien, Agglut. mit Choleraserum stets positiv	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von ziemlich großen, weißlichgrauen, glänzenden, choleraähnlichen Kolonien, die durch Choleraserum stets positiv beeinflußt werden.
4. Bac. enter. Gaertner 603 (Schwein)		„	„
1. Paratyphus B Kozuschek	Stuhl und Cholera Serb. IX	1. Sehr reichliche Entwicklung von zarten, rauchbraunen, durchscheinenden, choleraähnlichen Kolonien, die durch Choleraserum stets positiv beeinflußt werden. 2. Dazwischen vereinzelte, sehr feine, zarte Kolonien, die aus geraden Stäbchen bestehen und nach Überimpfung auf Agar mit Paratyphus B agglutinieren.	wie Dieudonné-Agar.
2. Bac. enter. Gaertner Darm		1. wie 1. 1. 2. Vereinzelte Kolonien, welche durch Gaertnerserum agglutiniert werden.	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von hellgrauen, zentral milchig getrübten, ziemlich großen, choleraähnlichen Kolonien. Agglut. mit Choleraserum stets positiv.
3. Bac. enter. Gaertner Moorseele (helle Kolonienform)		Üppiges, rasenförmiges Wachstum von durchscheinenden, zarten, rauchbraunen, choleraähnlichen Kolonien; Agglut. mit Choleraserum stets positiv.	„

Es ergab sich, daß auf allen Platten die Choleravibrionen, die Stuhlbakterien wie auch die künstlich zugesetzten Paratyphus- und Gaertnerbazillen vollständig überwuchert hatten. In allen Fällen fiel die orientierende Agglutination für Cholera positiv aus. Paratyphus B- und Gärtnerbazillen konnten dagegen durch die orientierende Agglutination jeweils nur in einem Falle festgestellt werden. Eine anschließend in der gleichen Weise ausgeführte Versuchsreihe, bei welcher nur an Stelle der Gaertner- und Paratyphus B-Bakterien Kulturmaterial von auf den Elektivnährböden gedeihenden Proteus- und Colistämmen zugefügt war, führte ebenfalls zu dem Ergebnis, daß die Choleravibrionen stets so reichlich zur Entwicklung kamen, daß in jedem Falle schon die orientierende Agglutination auf Cholera einen positiven Ausschlag gab.

Tabelle XII. Ausstriche verschiedener mit Cholera infizierter Stuhlproben, welche auf den Blutnährböden wachsende Coli- und Proteusstämme enthalten.

Bezeichnung des Stuhles	gemischt mit	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Pilon modifizierten Nährboden
1. Stuhl mit P. 8 (= D. 24)	mit Chol. 3 vir.	Ziemlich reichliches Wachstum von zarten, rauchbraunen, durchscheinenden Kolonien, Agglut. auf Chol. positiv.	Ziemlich reichliche Entwicklung von hellgrauen, zentral etwas milchig getrübten, flachen Kolonien, die auf Cholera positiv agglutinieren. Daneben vereinzelte, kleinere, durchscheinende, glänzende Kolonien, Agglut. negativ.
2. Stuhl mit P. 9 (= D. 25)		»	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von hellgrauen, zentral etwas milchig getrübten, saftigen Kolonien. Agglut. auf Chol. positiv.
3. Stuhl mit P. 11 (= D. 27)		Zahlreiche, hellbraune, durchscheinende ziemlich große Kolonien; Agglut. auf Chol. positiv. Daneben vereinzelte, äußerst feine, zarte, durchscheinende Kokkenkolonien.	»
4. Stuhl mit P. 13 (= D. 29)		Reichliche Entwicklung von zarten, rauchbraunen, durchscheinenden, mittelgroßen Kolonien; Agglut. auf Chol. positiv.	Dickes, rasenförmiges Wachstum von hellgrauen, zentral etwas milchig getrübten, flachen, kleinen Kolonien. Agglut. auf Chol. positiv.
5. Stuhl mit P. 22 (= D. 37)		»	»
6. Stuhl mit P. 26 (= D. 39)		Zahlreiche zarte, rauchbraune, durchscheinende, kleine Kolonien; Agglut. auf Chol. positiv. Daneben vereinzelte, feinste, durchschein. Kokkenkolonien.	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von hellgrauen, glänzenden, zentral milchig getrübten, saftigen Kolonien. Agglut. auf Chol. positiv. Dazwischen verstreut einzelne, kleine, trübgraue Kolonien (Bac. faec. alkalig.).
1. Stuhl mit P. 7 (= D. 23)	mit Chol. B. 2	Reichliches Wachstum von großen, rauchbraunen, durchscheinenden Kolonien; Agglut. auf Chol. positiv.	Reichliche Entwicklung von hellgrauen ziemlich großen, glänzenden, zentral milchig getrübten, flachen Kolonien; dazwischen ganz vereinzelt zarte feine nicht agglutin. Kolonien.
2. Stuhl mit P. 10 (= D. 26)		»	»
3. Stuhl mit P. 14 (= D. 31)		Zahlreiche, zarte, durchscheinende, rauchbraune, mittelgroße Kolonien; Agglut. auf Chol. positiv. Dazwischen verstreut einzelne kleine, mattgraue Kolonien, die nicht durch Chol.-serum agglutiniert werden.	Üppiges rasenförmiges Wachstum, ziemlich großer, hellgrauer, zentral milchig getrübter Kolonien; Agglut. auf Chol. positiv.

Bezeichnung des Stuhles	gemischt mit	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Pilon modifizierten Nährboden
4. Stuhl mit P. 21 (= D. 36)	mit Chol. 3 vir.	Dichtes, rasenförmiges Wachstum von zarten, rauchbraunen, durchscheinenden Kolonien; Agglut. auf Chol. positiv.	Üppiges rasenförmiges Wachstum, ziemlich großer, hellgrauer, zentral milchig getrübter Kolonien; Agglut. auf Chol. positiv.
5. Stuhl mit P. 42 (= D. 42)		"	"
6. Stuhl mit P. 45 (= D. 43)		"	"

Wie aus der Tabelle ersichtlich, sind auch bei diesen Versuchen die beigemengten Proteus- und Colistämme sämtlich in allen Fällen durch die Choleravibrionen überwuchert worden. Dagegen war dies nicht, wenigstens nicht mehr in so ausgesprochener Weise der Fall bei der folgenden Versuchsreihe, bei welcher den Stuhlgemischen noch Kulturmaterial zugefügt war von Alkaligenesstämmen, die aus den bei den vorigen Versuchen benutzten Stuhlproben gezüchtet waren.

Wie schon aus den Versuchsergebnissen des Abschnittes II hervorgeht, wird abgesehen von choleraähnlichen Vibrionen in erster Linie der Bac. Alkaligenes, der ja wie auch choleraähnliche Vibrionen besonders bei Darmerkrankungen häufiger und reichlicher im Stuhl vorkommt, bei den Cholerauntersuchungen in der Praxis als Konkurrenzbakterium auf den Elektivnährböden in Betracht kommen. Wir haben deshalb bei den folgenden Versuchen, zu welchen verschiedene mittels der Elektivnährböden frisch isolierte Alkaligenesstämme benutzt wurden, neben dem Dieudonnéschen Originalnährboden, nicht nur die Pilonsche sondern auch die Eschsche Modifikation und den in getrockneter Form aufbewahrten Dieudonnéschen Agar herangezogen (s. Tab. XIII, S. 403 u. 404).

Bei diesen Versuchen hatte zwar auch die erste orientierende Agglutination mit einer Ausnahme noch in allen Fällen ein positives Ergebnis für Cholera, es mußte aber verschiedentlich recht reichlich Material dazu genommen werden. Daneben wurden bei dieser Versuchsreihe aber noch auf allen Platten Kolonien gefunden, die nicht mit Choleraserum agglutinierten.

Bei den vergleichenden Untersuchungen über das konkurrierende Verhalten von choleraähnlichen Vibrionen gegenüber Cholera auf den Spezialnährböden wurden die ersten Versuche mit Reinkulturen von Cholera und choleraähnlichen Vibrionen angestellt, um zunächt zu sehen wie Cholera und andere Vibrionenarten allein sich gegenseitig beeinflussen. Die Kulturen — 4 Cholera und 6 Vibrionenstämme — wurden auf dem Dieudonnéschen Originalagar und auf dem Nährboden nach Esch geprüft. Von den Vibrionenkulturen stammten 4 ebenfalls aus menschlichem Stuhl.

Zur Aussaat auf den Platten wurden jeweils 1 Öse einer Kochsalzaufschwemmung von je $^1/_5$ Öse Cholera und $^1/_5$ Öse Vibrionenkultur in 20 ccm NaCl verwandt.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle XIV (S. 405 u. 406) zusammengestellt.

Tabelle XIII. Ausstriche verschiedener mit Cholera und Bac. faec. alkalig. infizierter Stuhlproben.

Bezeichnung der Bac. faec. alkalig. Kulturen	gemischt mit	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem in getrockneter Form aufbewahrten Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Esch modifiziert. Nährboden	Wachstum auf dem nach Pilon modifiziert. Nährboden
1. K. 4	Chol. F. u. Stuhl	Üppiges, rasenförmiges Wachstum, von zarten, kleinen, hellen Kolonien (Cholera), zwischen denen sich vereinzelte, weißgraue Kolonien (Bac. faec. alkalig.) finden. Agglutination auf Cholera stets positiv.	Wie auf Dieudonné-Agar.	—	—
2. K. 8		Sehr reichliches Wachstum von großen, trüben, rauchbraunen Kolonien (Cholera), daneben vereinzelt weißlichgraue Kolonien. (Bac. faec. alkalig.) Agglut. entsprechend.	„	—	—
3. Lichterfelde		Üppige Entwicklung von ziemlich gleichartigen, zarten, durchscheinenden Kolonien, die durch Choleraserum stets positiv beeinflußt werden.	Sehr reichliches Wachstum von teils trüberen, weißlichgrauen, teils besser durchscheinenden, rauchbraunen, miteinander innig gemengten Kolonien. Das Gemisch bei Verwendung reichlichen Materials durch Choleraserum stets positiv beeinflußt.	—	—
4. K. 10 (= D. 17)		Rasenartiges Wachstum innig gemischter, zarter, teils graubrauner, teils rauchbrauner, trüber Kolonien; Agglutinationsversuch stets positiv.	Wie auf Dieudonné-Agar.	—	—
5. K. 11 (= D. 18)	Chol. C. u. Stuhl	Üppiges Wachstum von helleren, zarten, mehr durchscheinenden, rauchbraunen, und viel spärlicheren, hellgrauen, trüben Kolonien (Bac. faec. alkalig.); Agglut. durch Choleraserum stets positiv.	Überwiegend helle, durchscheinende, rauchbraune, zarte Kolonien (Cholera) und daneben vereinzelte, kleinere, gut abgrenzbare, hellgraue, saftige Kolonien (Bac. faec. alkalig.). Agglut. entsprechend.	—	—

Bezeichnung der Bac. faec. alkalig. Kulturen	gemischt mit	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem in getrockneter Form aufbewahrten Dieudonnéschen Nährb.	Wachstum auf dem nach Esch modifiziert. Nährboden	Wachstum auf dem nach Pilon modifizierten Nährboden
1. E. 11 (= D. 5)	Chol. 74 u. Stuhl	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von zarten, durchscheinenden, rauchbraunen Kolonien, die durch Choleraserum positiv agglutiniert werden; daneben besonders am Rand der Platte einzelne etwas hellere, kleinere, undurchsichtige Kolonien. Agglutination der auf Agar überimpften Kolonien negativ.	—	wie auf Dieudonné-Agar	—
2. E. 12 (= D. 6)		»	—	»	—
3. E. 51 (= D. 15)		Neben überwiegend hellen, durchscheinenden, rauchbraunen, mittelgroß. Cholerakolonien, kleine, trübe, graugrüne Kolonien, die nach Überimpfung auf Agar, mit Choleraserum nicht agglutinieren.	—	»	—
4. P. 3 (= D. 21)	Chol. Ch. u. Stuhl	Reichliches Wachstum von innig gemischten, vorwiegend rauchbraun., ziemlich großen, durchscheinenden und weniger zahlreichen, kleineren, hellgrauen, trüberen Kolonien, von denen die ersteren durch Choleraserum positiv beeinflußt werden.	—	—	Üppiges, rasenförmiges Wachstum v. hellgrauen, zentral milchig getrübten, saftigen Kolonien; Aggl. auf Cholera positiv. Dazwischen diesen ähnliche, kleinere Kolonien in geringer Zahl eingestreut. Aggl. negativ auf Cholera.
5. P. 36 (= D. 40)		Reichliche Entwicklung von hellen, rauchbraunen, zarten, durchscheinenden Kolonien, Aggl. auf Chol. positiv.	—	—	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von mittelgroß., flachen, hellgrauen, zentral milchig getrübten, glänzend. Kolonien. Aggl. auf Chol. positv.
6. P. 46		Am Rande vereinzelte, durchscheinende Kokkenkolonien.	—	—	»

Tabelle XIV. Ausstriche aus Kulturgemischen von Cholera und choleraähnlichen Vibrionen.

Bezeichnung der Vibrionenstämme	gemischt mit	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Esch modifizierten Nährboden
1. Vibr. Krüger		Reichliche Entwicklung von zarten, rauchbraunen, choleraähnlichen Kolonien, die bei Entnahme von 5 verschiedenen Stellen mit Choleraserum 5 mal positiv agglutinieren.	Kolonienbildung zeigt wie bei Dieudonné keine Unterschiede. Agglutination auf Cholera 3 mal positiv, 2 mal negativ.
2. Vibr. Knodorf		Kolonien wie bei 1. Die Agglut. auf Cholera 5 mal positiv.	Ebenfalls Wachstum von Kolonien wie bei 1. Agglutination auf Cholera 5 mal positiv.
3. Vibr. Ciman		Vereinzelte, hellgraue, undurchsichtige Kolonien (Vibr. Ciman) neben sehr zahlr., durchsichtigen rauchbraunen Cholerakolonien, Agglutinationsversuch 5 mal posit.	Wie bei Dieudonné-Agar.
4. Vibr. Klist	Chol. 74 vir.	Reichliches Wachstum von zarten durchscheinenden, rauchbraunen Kolonien, die 5 mal positiv auf Cholera agglutinieren.	Neben zahlreichen, rauchbraunen, durch Choleraserum beeinflußten Kolonien noch verschiedene leicht getrübte, mattgraue, undurchsichtige Kolonien, die nicht agglutinieren.
5. Vibr. Metschnikoff		Meist durchscheinende, zarte, rauchbraune, auf Choleraserum positiv reagierende Kolonien, daneben vereinzelte, hellgraue, flache Kolonien von Vibrio Metschnikoff.	Wie bei Dieudonné-Agar.
6. Vibr. Elwers		Reichliches Wachstum von zarten, durchscheinenden, kleinen Kolonien. Agglutinationsversuch 5 mal positiv.	Neben zahlreichen, größeren, durchscheinenden, braunen Kolonien, die mit Choleraserum positiv reagieren, noch zahlreiche, kleinere, mehr weißlichgraue Kolonien, die durch Choleraserum nicht beeinflußt werden (Vibr. Elwers).
1. Vibr. Krüger		Kein Unterschied zwischen den reichlich gewachsenen, rauchbraunen, zarten Kolonien, die leicht grünlich schimmern. Agglutination mit Choleraserum 5 mal positiv.	Reichliche Entwicklung von leicht grünbraunen, zarten, durchscheinenden, flachen Kolonien, die mit Choleraserum 2 mal positiv, 7 mal negativ reagieren.
2. Vibr. Knodorf	Chol. Heubeck	Zahlreiche, zarte, rauchbraune Kolonien, daneben vereinzelt kleine, weißlich-grüne Kolonien. Agglut. der ersten Kolonien mit Choleraserum stets positiv, der anderen negativ.	Wie bei Dieudonné-Agar.
3. Vibr. Ciman		»	»

Bezeichnung der Vibrionenstämme	gemischt mit	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Esch modifizierten Nährboden
4. Vibr. Klist	Chol. Heubeck	Üppiges Wachstum von zarten, flachen, durchscheinenden Kolonien, die keine Unterschiede aufweisen. Agglutinationsversuch auf Cholera 5 mal positiv.	Wie bei Dieudonné-Agar.
5. Vibr. Metschnikoff		„	2 Arten von Kolonien. Neben feinen, durchscheinenden, rauchbraunen Kolonien, die mit Choleraserum agglutinieren, auch weißgraue Kolonien, bei denen Agglutination negativ.
6. Vibr. Elwers		Reichliches Wachstum von kleinen, zarten, durchscheinenden Kolonien. Agglutinationsversuch 5 mal positiv.	Wie bei Dieudonné-Agar.
1. Vibr. Krüger	Chol. Ch.	Überwiegend rauchbraune Kolonien, die durch Choleraserum agglutiniert werden. Daneben auch etwas größere, weißgraue Kolonien, bei denen Agglutinationsversuch negativ.	Wie bei Dieudonné-Agar; nur sind die großen weißgrauen Kolonien zahlreicher.
2. Vibr. Knodorf		Zahlreiche, rauchbraune, zarte, als Cholera festgestellte Kolonien, daneben vereinzelt weißlichgraue Vibrionenkolonien.	2 Arten von Kolonien, sehr zahlreiche zarte, kleine Cholerakolonien und daneben ebenfalls üppig gewachsen, weißlich-graue, saftige, größere Vibrionenkolonien.
3. Vibr. Ciman		Zahlreiche, durchscheinende, rauchbraune, gleichartige Kolonien, die 5 mal mit Choleraserum positiv reagieren.	Wie bei Dieudonné-Agar.
4. Vibr. Klist		Überwiegend graubraune, zarte Cholerakolonien, daneben vereinzelt, weißgraue Vibrionenkolonien.	2 Arten von Kolonien reichlich entwickelt: etwas zahlreicher weißgraue, größere, saftige Kolonien (Vibrio Klist), weniger häufig kleinere, zarte, rauchbraune Cholerakolonien.
5. Vibr. Metschnikoff		Neben vereinzelten, weißgrauen, undurchsichtigen, zahlreichere, rauchbraune, durchscheinende Kolonien, von denen die letzteren durch Choleraserum beeinflußt werden.	Wie bei Dieudonné-Agar.
6. Vibr. Elwers		Üppiges Wachstum von zarten, durchscheinenden, einheitlichen Kolonien. Agglutination auf Chol. 5 mal positiv.	„

Bezeichnung der Vibrionenstämme	gemischt mit	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Esch modifizierten Nährboden
1. Vibr. Krüger	Chol. Ruhleb.	Neben hellgrauen Vibrionen-Kolonien zahlreiche kleinere, zarte, durchscheinende, rauchbraune Cholerakolonien.	Wie auf Dieudonné-Agar.
2. Vibr. Knodorf		Zahlreiche, gleichartige, rauchbraune Kolonien, die stets durch Choleraserum positiv beeinflußt werden.	„
3. Vibr. Ciman		„	„
4. Vibr. Klist		„	„
5. Vibr. Metschnikoff		Ziemlich reichliches Wachstum von 2 Kolonieformen: 1. Weißlichgraue, größere und 2. zarte, durchscheinende, mehr rauchbraune Kolonien, von denen die letzteren durch Choleraserum beeinflußt werden.	„
6. Vibr. Elwers		Noch deutlich erkennbare Unterschiede von 2 Kolonienarten, helle und rauchbraune, die beide innig miteinander vermengt sind. Agglutination mit reichlichem Material 5 mal auf Chol. positiv.	Wie auf Dieudonné-Agar; nur sind die Unterschiede zwischen den beiden Kolonienarten auf diesem Nährboden stärker hervortretend.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß auch bei dieser Versuchsanordnung im allgemeinen eine Überwucherung der Cholerakeime durch andere Vibrionen nicht stattfindet. Auf dem Eschschen Agar kamen aber die choleraähnlichen Vibrionen neben der Cholera im allgemeinen reichlicher zur Entwicklung als auf dem Dieudonné-Originalagar.

Die Versuche mit Stuhlproben, welche künstlich mit Cholera und choleraähnlichen Vibrionen infiziert waren, führten zu ähnlichen Ergebnissen (s. Tab. XV, S. 408 und 409).

Wie aus der Tabelle XV hervorgeht, kam es auch hier auf dem Nährboden nach Esch im allgemeinen zu einem stärkeren Wachstum der choleraähnlichen Vibrionen als auf dem Dieudonnéschen Originalagar.

Ein Cholerastamm, die Cholera Ch, wurde in dieser Reihe von dem Vibrio Krüger sogar etwas überwuchert, so daß auf diesen Platten trotz reichlicher Materialverwendung der orientierende Agglutinationsversuch 2mal negativ ausfiel. Es wäre aber auch in diesem Falle doch noch möglich gewesen, die Choleradiagnose zu sichern, da neben den beiden negativen Agglutinationsbefunden auch 3 positive mit Material von denselben Platten erzielt wurden. Selbst unter diesen absichtlich für die Choleraentwicklung

Tabelle XV. Ausstriche von mit Cholera- und choleraähnlichen Vibrionen infizierten Stuhlproben.

Bezeichnung der Vibr.-Stämme	gemischt mit	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Esch modifizierten Nährboden
1. Vibr. Krüger	Chol. Ch. u. Stuhl	Weißlichgraue Kolonien, innig vermischt mit dunkleren, rauchbraunen Kolonien (Cholera). Agglut. auf Chol. nur bei Verwendung von ziemlich reichlichem Material positiv, aber dann regelmäßig.	Überwiegend weißlich graue Kolonien, innig vermischt mit dunkleren, rauchbraun. (Cholera)-Kolonien. Auch bei Verwendung reichlichen Materials Agglutinationsversuch 2 mal negativ, 3 mal positiv.
2. Vibr. Knodorf		Zahlreiche helle, durchscheinende, größere Cholerakolonien, dazwischen verstreut hellgraue, trübe, undurchsichtige, kleinere Kolonien von Vibr. Knodorf.	Wie auf Dieudonné-Agar.
3. Vibr. Ciman		Üppiges Wachstum von hellen, durchscheinenden, rauchbraunen (Cholerakol.) und weißlich grauen, trüben Kolonien (= Vibr. Ciman). Agglut. bei Verwendung von ziemlich reichlichem Material stets positiv.	Wie auf Dieudonné-Agar.
4. Vibr. Klist		Unter zahlreichen, rasenförmig wachsenden, rauchbraunen, durchscheinenden Cholerakolonien finden sich verstreut mattgraue, flache, undurchsichtige Vibrionenkolonien.	Inniges Gemisch von hellen, rauchbraunen, durchscheinenden und zahlreichen hellgrauen, trüberen Kolonien. Nur bei Verwendung v. reichlichem Material. Agglutination positiv.
5. Vibr. Metschnikoff		Teils helle, durchschein. Kolonien. (Choleravibr.). Daneben weniger zahlreich weißlich graue Kolonien (Vibrio Metsch.). Agglut. bei Verwendung von ziemlich reichlichem Material 5 mal positiv auf Chol.	Dichter Rasen von Kolonien, die teils hell, durchscheinend, teils weißlich grau, innig gemengt sind. Agglutinat. wie bei Dieudonné-Agar.
6. Vibr. Elwers		Reichliches Wachstum von gleichartigen, hellen, durchscheinenden Kolonien, die auf Choleraserum 5 mal positiv agglutinieren.	Wie auf Dieudonné-Agar.
1. Vibr. Krüger	Chol. Ruhr. u. Stuhl	Reichliches Wachstum von hellgrauen, trüberen Vibrionen-Kolonien u. daneben von zarten, durchscheinenden, rauchbraunen Cholerakolonien. Agglutination bei Verwendung reichlichen Materials stets positiv.	Wie auf Dieudonné-Agar. Die Unterschiede zwischen den Kolonienarten sind deutlicher ausgesprochen.
2. Vibr. Knodorf		Sehr zahlreiche helle und trübere, rauchbraune Kolonien, von denen die letzteren auf Choleraserum stets positiv reagieren.	Wie auf Dieudonné-Agar.

Bezeichnung der Vibr.-Stämme	gemischt mit	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Esch modifizierten Nährboden
3. Vibr. Ciman	Chol. Ruhleb. u. Stuhl	Zahlreiche, helle, durchscheinende Cholerakolonien, daneben einige weißlich graue, undurchsichtige Vibrionenkolonien.	Innig gemengte, rasenförmig gewachsene helle, durchscheinende und trübere, weißlich graue Kolonien, die nicht voneinander isoliert werden können. Agglutinationsprüfung mit reichlichem Material auf Chol. 5 mal positiv.
4. Vibr. Klist		Neben vorwiegend hellen, rauchbraunen, größeren Cholera- auch weniger trübe, weißlich graue, kleinere Vibrionen-Kolonien.	Wie auf Dieudonné-Agar.
5. Vibr. Metschnikoff		Überwiegend helle, durchscheinende, rauchbraune Cholera- und daneben weißgraue, undurchsichtige Vibrionen-Kolonien.	Wie auf Dieudonné-Agar.
6. Vibr. Elwers		Üppiges Wachstum von rauchbraunen, gleichartigen, zarten Kolonien, deren Prüfung durch Choleraserum stets positiv ausfällt.	—

ungünstig gewählten Bedingungen haben sich sonach in dieser Versuchsreihe beide Nährböden doch recht gut bewährt, wenn auch zuzugeben ist, daß die Modifikation nach Esch dem Originalagar von Dieudonné bezgl. der Elektivität nachsteht. Eine geringere Elektivität muß man auch nach den Versuchen des Abschnittes II für den Pilonschen Nährboden annehmen, wir haben deshalb mit diesem besondere Versuche in dieser Hinsicht nicht weiter angestellt. Dagegen haben wir in derselben Weise noch eine kleinere Vergleichsreihe zwischen dem Dieudonnéschen Originalagar und dem in getrockneter Form aufbewahrten Blutalkaliagar vorgenommen. Es haben sich dabei besondere Unterschiede zwischen diesen beiden Nährböden nicht feststellen lassen.

Für die Abkürzung der Choleradiagnose wäre es nun von großer Bedeutung, wenn mit Kulturmaterial von den ersten auf den Elektivnährböden angelegten Stuhlplatten bereits die definitive quantitative Agglutination und der Pfeiffersche Versuch ausgeführt werden könnten. Es sind deshalb auch nach dieser Richtung hin Versuche ausgeführt worden, die zu dem Ergebnis geführt haben, daß häufig bei reichlichem Cholerawachstum von den ersten Stuhlplatten schon die Ausführung der quantitativen Agglutination und in manchen Fällen auch die Vornahme des Pfeifferschen Versuchs möglich ist.

Bei spärlichem Cholerawachstum oder bei gleichzeitiger reichlicher Entwicklung von choleraähnlichen Vibrionen oder Alkaligenes auf den Platten, wie es ja unter den praktischen Verhältnissen ebenfalls vorkommen wird, ist es aber doch notwendig, erst eine Agarkultur anzulegen und erst mit dieser die betr. Reaktionen durchzuführen.

Zusammenfassend ergibt sich aus den gesamten Versuchen, daß die geprüften Elektivnährböden gegenüber den bisher gebräuchlichen Nährböden für die Choleradiagnose wesentliche Vorteile bieten.

Ihre Anwendung erleichtert die Choleradiagnose und ermöglicht sie in den meisten Fällen in kürzerer Zeit wie bisher zu stellen.

Der Dieudonnésche Originalagar hat sich bezgl. der Elektivität unter den geprüften Choleranährböden am besten bewährt und sich am zuverlässigsten erwiesen. Er hat allerdings den, hauptsächlich für die Feststellung erster Cholerafälle in Betracht kommenden Nachteil, daß er nicht sofort, sondern erst ca. 18—24 Stunden nach dem Ausgießen der Platten brauchbar ist. In solchen Fällen werden zunächst die Modifikationen zu benutzen sein. Besonders geeignet erscheint uns für diesen Zweck die Benutzung des in getrockneter Form aufbewahrten Dieudonnéagars, aber auch die Modifikationen nach Pilon und Esch und nach Neufeld-Woithe können in diesen Fällen vorteilhaft herangezogen werden. Die letztere Modifikation steht, was die Elektivität für Cholera anbelangt, dem Originalnährboden von Dieudonné am nächsten und ist ihm in dieser Hinsicht vielleicht sogar etwas überlegen, sie hat aber den Nachteil, daß sie gelegentlich versagen kann, indem auch Cholera auf ihr, wie früher schon erwähnt, nicht zur Entwicklung kommt.

Die von Pilon und von Esch angegebenen Modifikationen stehen sich ziemlich gleich. Mit ihnen kann man sich jedenfalls in kurzer Zeit bereits einen für die Untersuchung erster Cholerafälle brauchbaren, den früheren Nährböden weit überlegenen Elektivnährboden herstellen; für die weiteren Untersuchungen würde dann aber unseres Erachtens der Dieudonnésche Originalnährboden wegen seiner größeren Elektivität vorzuziehen sein.

IV.

Ergebnisse der Prüfung des von Ottolenghi angegebenen Galleanreicherungsverfahrens.

Wenn nun auch die Choleraelektivnährböden für die bakteriologische Choleradiagnose in der Praxis einen wesentlichen Fortschritt und eine außerordentliche Erleichterung bedeuten, so können doch auch sie in einem kleinen Prozentsatz der Fälle und zwar bei solchen Erkrankungen versagen, bei denen die Cholerakeime nur so spärlich in den Entleerungen enthalten sind, daß ihr Nachweis nur nach ihrer Anreicherung gelingt. Das bisher zu diesem Zweck angewandte Peptonwasseranreicherungsverfahren von Schottelius hat im allgemeinen gute Resultate geliefert; die Herstellung eines besonderen Choleranährbodens durch Dieudonné hat aber auch Veranlassung gegeben, in dieser Richtung nach verbesserten Verfahren und nach Anreicherungsmitteln zu suchen, welche eine größere Spezifität für Cholera besitzen als das Peptonwasser. Von diesem Gesichtspunkte aus hat Ottolenghi die Verwendung von Ochsengalle, der 3 % einer 10 %igen wässerigen Lösung von kristallisiertem Natriumkarbonat zugesetzt ist, zur Anreicherung der Choleravibrionen aus menschlichen Faeces empfohlen. Wir haben mit dieser neuen Methode im Vergleich zu dem bisher gebräuchlichen Peptonwasseranreicherungsverfahren ebenfalls

einige Versuche angestellt, deren Ergebnisse hier zum Schluß noch kurz mitgeteilt seien. Bei dem ersten Versuch wurden in 12 Reagenzröhrchen je 2 ccm verdünnten menschlichen Stuhls eingefüllt und jedem Röhrchen außerdem noch 1 ccm einer Aufschwemmung von Bac. alkaligenes (1 Öse auf 20 ccm destilliertes Wasser) zugesetzt. Vier von diesen 12 Röhrchen erhielten noch je 0,2 ccm, vier andere je 0,1 ccm und die 4 letzten Röhrchen endlich je 0,05 ccm einer Choleraaufschwemmung (1 Öse auf 40 ccm destilliertes Wasser). Zu den Bakterienaufschwemmungen war destilliertes Wasser benutzt worden, weil dieses eine etwas geringere schädigende Wirkung auf Choleravibrionen ausübt wie die Kochsalzlösung. In je 6 von den 12 so vorbereiteten Stuhlröhrchen wurden nun jeweils 5 ccm Peptonwasser bezw. 5 ccm Ochsengalle, welche mit 3 % einer 10 %igen wässerigen Lösung von kristallisiertem Natronkarbonat versetzt war, in der Weise zugesetzt, daß in jeder der 6 Röhrchen umfassenden Reihe je 2 Röhrchen vorhanden waren, welche jeweils 0,2, 0,1 bezw. 0,05 ccm der Choleraaufschwemmung erhalten hatten. Nach 4- und 24stündigem Aufenthalt bei 37 ° wurden aus den Röhrchen mikroskopische Präparate untersucht und beide Male auch je eine Plattenserie auf Dieudonnéschem Blutalkaliagar und auf gewöhnlichem Agar angelegt. Die gewöhnliche Agarplatte wurde deshalb zu diesen Versuchen mit benutzt, weil in diesen Reihen möglichst allen in den einzelnen Versuchsröhrchen enthaltenen Bakterienarten die Möglichkeit der Entwickelung auf den Testplatten gegeben werden sollte, um ein deutliches Bild über die Zusammensetzung der Bakterienflora der einzelnen Röhrchen und die etwaige Anreicherung der Choleravibrionen bezw. die evtl. Unterrückung der übrigen Keime zu gewinnen. Die Heranziehung des Dieudonné-Agar sollte Aufschluß geben, welches Anreicherungsverfahren für die Ausstriche auf den Elektivnährböden die besten Ergebnisse liefert.

Die Beimengung einer Alkaligenesaufschwemmung zu den Stuhlproben erfolgte aus dem Grunde, um festzustellen, wie sich bei beiden Anreicherungsverfahren Cholera und der Bac. alkaligenes beeinflussen.

Wir hielten eine derartige Prüfung aus dem Grunde für erwünscht, weil, wie bereits erwähnt, der Bac. Alkaligenes sich bei pathologischen Vorgängen im Darm, also wohl auch bei Cholerakranken häufig findet. Diese Annahme haben wir bereits im Verlauf unserer Untersuchungen insofern bestätigt gesehen, als von 16 uns aus dem Auslande zugegangenen, ganz frisch isolierten Cholerakulturen 8 Beimengungen von Bacillus faecalis alkaligenes enthielten. Die Ergebnisse des ersten Versuchs sind aus den nachstehenden Tabellen XVI, XVII und XVIII (S. 412—414) ersichtlich.

Was zunächst die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung anlangt, so könnte es danach zunächst den Anschein haben, als ob in der Galle bei diesen Versuchen eine geringere Anreicherung der Cholera stattgefunden hat als in dem Peptonwasser. Wie aus den in den Tabellen XVII und XVIII zusammengestellten Ergebnissen der Plattenversuche jedoch hervorgeht, ist dies aber keineswegs der Fall. Nach 4stündiger Bebrütung ist der Choleranachweis mittels des Peptonwasseranreicherungsverfahrens auf der Dieudonnéplatte zwar immer, auf der Agarplatte aber nur aus den beiden Röhrchen gelungen, welche mit 0,2 ccm der Choleraaufschwemmung beschickt waren. Nach 24stündiger Bebrütung gelang der Cholera-

Tabelle XVI.

1. Versuch. Mikroskopische Untersuchung im gefärbten Ausstrichpräparat.

Nr.	Mischungsverhältnis der dem Stuhl zugesetzten Bakterien	Galle-Anreicherung		Peptonwasser-Anreicherung	
		nach 4 Stunden	nach 24 Stunden	nach 4 Stunden	nach 24 Stunden
1	0,2 ccm Cholera- u. 1 ccm Alkaligenes-Aufschwemmung	Zahlreiche Vibrionen im Gesichtsfeld	Spärliche Vibrionen im Gesichtsfeld	Sehr zahlreiche Vibrionen im Gesichtsfeld	Sehr zahlreiche, oft in Haufen angeordnete Vibrionen im Gesichtsfeld
2	desgl.	Spärliche Vibrionen im Gesichtsfeld	Sehr zahlreiche, häufchenförmig angeordnete Vibrionen in jedem Gesichtsfeld	Sehr zahlreiche, in Gruppen beisammenliegende Vibrionen im Gesichtsfeld	Zahlreiche Vibrionen über das Gesichtsfeld verstreut, meist schlecht gefärbt
3	0,1 ccm Cholera- u. 1 ccm Alkaligenes - Aufschwemmung	Sehr zahlreiche Vibrionen im Gesichtsfeld	Sehr spärliche, meist vereinzelte Vibrionen im Gesichtsfeld	desgl.	desgl.
4	desgl.	Zahlreiche Vibrionen im Gesichtsfeld	desgl.	Zahlreiche, häufig in Zügen angeordnete Vibrionen im Gesichtsfeld	desgl.
5	0,05 ccm Cholera- u. 1 ccm Alkaligenes - Aufschwemmung	Sehr zahlreiche Vibrionen im Gesichtsfeld	Ganz vereinzelte Vibrionen im Präparat, so daß meist mehrere Gesichtsfelder hintereinander frei sind	Zahlreiche Vibrionen im Gesichtsfeld	Sehr zahlreiche, schlecht gefärbte Vibrionen im Gesichtsfeld
6	desgl.	Zahlreiche Vibrionen im Gesichtsfeld	Spärliche Vibrionen im Gesichtsfeld	Sehr zahlreiche, häufig in Gruppen angeordnete Vibrionen im Gesichtsfeld	Zahlreiche, meist schlecht gefärbte Vibrionen i. Gesichtsfeld

Tabelle XVII.

1. Versuch. Plattenausstriche nach Anreicherung mittels Peptonwasser.

Nr.	Mischungsverhältnis der dem Stuhl zugesetzten Bakterien	Wachstum auf der Agarplatte		Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	
		nach 4 Stunden	nach 24 Stunden	nach 4 Stunden	nach 24 Stunden
1	0,2 ccm Cholera- und 1 ccm Alkaligenes-Aufschwemmung	Sehr zahlreiche, verschiedenartige Kolonien v. Bact. coli; dazwischen verstreut 32 helle, durchscheinende Cholerakolonien	Sehr reichliche Entwicklung von verschiedenartigen Kolonien des Bact. coli	228 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien	11 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien

Nr.	Mischungsverhältnis der dem Stuhl zugesetzten Bakterien	Wachstum auf der Agarplatte		Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	
		nach 4 Stunden	nach 24 Stunden	nach 4 Stunden	nach 24 Stunden
2	0,2 ccm Cholera- u. 1 ccm Alkaligenes - Aufschwemmung	Sehr zahlreiche, verschiedenartige Bac. coli - Kolon., zwischen denen vereinzelte, helle Cholerakolonien liegen	Sehr zahlreiche Entwicklung von verschiedenartigen Kolonien des Bact. coli	233 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien	92 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien
3	0,1 ccm Cholera- u. 1 ccm Alkaligenes - Aufschwemmung	Sehr zahlreiche Kolonien v. Bact. coli verschiedener Art	desgl.	158 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien	—
4	desgl.	desgl.	desgl.	78 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien	—
5	0,05 ccm Cholera- u. 1 ccm Alkaligenes - Aufschwemmung	desgl.	desgl.	22 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien; daneben zahlr. äußerst feine Staphylokokkenkolonien	—
6	desgl.	Zahlreiche, verschiedenartige Kolonien v. Bact. coli und vereinzelte kleinere Kolonien v. Bac. faec. alkalig.	desgl.	134 große, rauchbraune, glänzend. Cholerakolonien	—

Tabelle XVIII.

1. Versuch. Plattenausstriche nach Anreicherung mittels Galle.

Nr.	Mischungsverhältnis der dem Stuhl zugesetzten Bakterien	Wachstum auf der Agarplatte		Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	
		nach 4 Stunden	nach 24 Stunden	nach 4 Stunden	nach 24 Stunden
1	0,2 ccm Cholera- u. 1 ccm Alkaligenes - Aufschwemmung	Sehr reichliches Wachstum v. verschiedenartigen Bact. coli - Kolonien, zwischen denen vereinzelte, zarte Cholerakolonien liegen	Sehr zahlreiche, verschiedenartige Bact. coli - Kolonien u. daneben vereinzelte, zarte Cholerakolonien	135 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien	35 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien

Nr.	Mischungsverhältnis der dem Stuhl zugesetzten Bakterien	Wachstum auf der Agarplatte		Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	
		nach 4 Stunden	nach 24 Stunden	nach 4 Stunden	nach 24 Stunden
2	0,2 ccm Cholera- u. 1 ccm Alkaligenes - Aufschwemmung	Sehr reichliches Wachstum v. verschiedenartigen Bact. coli-Kolon., zwischen denen vereinzelte, zarte Cholerakolonien liegen	Reichl. Wachstum verschiedenartig. Kolonien v. Bact. coli	40 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien	91 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien
3	0,1 ccm Cholera- u. 1 ccm Alkaligenes - Aufschwemmung	Sehr zahlr. verschiedenartige Kolonien v. Bact. coli	desgl.	152 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien	35 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien
4	desgl.	Sehr reichliches Wachstum von verschiedenartig. Bact. coli-Kolonien, daneben einzelne, kleine, gelbweiße Staphylokokkenkolonien	desgl.	93 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien	14 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien
5	0,05 ccm Cholera- u. 1 ccm Alkaligenes - Aufschwemmung	Reichl. Entwicklung von verschiedenartigen Kolonien des Bact. coli	desgl.	98 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien	1 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonie
6	desgl.	desgl.	desgl.	35 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien	493 mittelgroße, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien

nachweis mittels Peptonwasser auch auf den Dieudonné-Platten aber überhaupt nur noch aus denselben beiden Röhrchen. Die mit der Galleanreicherungsmethode nach 4stündiger Bebrütung erhaltenen Ergebnisse sind etwa den mit dem Peptonwasser erzielten entsprechend. Nach 24stündiger Bebrütung liefert das Galleverfahren in diesem Versuch aber wesentlich bessere Resultate wie die Peptonwassermethode, indem auf Dieudonné-Agar auch nach 24stündiger Anreicherung in jedem Falle der Choleranachweis noch gelang und auch aus dem einen der mit 0,1 ccm Cholera beschickten Röhrchen auf der Agarplatte noch Cholerakolonien zum Wachstum kamen. Die Erscheinung, daß in diesem Versuche nach 24stündiger Anreicherung in Peptonwasser bei einem großen Teil der Versuchsröhrchen die Cholerakeime abgestorben waren, während dies in den Gallenröhrchen nach dieser Zeit noch nicht der Fall war, spricht in gewissem Sinne dafür, daß tatsächlich in den letzteren die Überwucherung der Choleravibrionen durch andere Keime in stärkerem Maße verhindert wird als in

den Peptonwasserröhrchen. Allerdings war auch daran zu denken, daß das Absterben der Cholerakeime in dem Peptonwasser auf einer erheblichen Verminderung der alkalischen Reaktion dieses Nährbodens infolge der Entwicklung der übrigen Keime beruhen könne. Diese Annahme erwies sich jedoch als nicht zutreffend, da die Peptonwasserröhrchen alle auch nach 24stündiger Bebrütung noch eine stark ausgesprochen alkalische Reaktion aufwiesen. Auffallend war es ferner, daß die Plattenausstriche auf Dieudonné-Agar aus den 24 Stunden angereicherten Peptonwasserröhrchen zum Teil steril blieben, obwohl im gefärbten mikroskopischen Präparat zahlreiche Vibrionenformen sichtbar waren. Vermutlich handelt es sich hier hauptsächlich um abgestorbene Keime; die Beobachtung, daß sich in diesen Fällen die Vibrionenformen meist nur schlecht gefärbt hatten, läßt sich wenigstens in diesem Sinne deuten. Die Tatsache, daß aus einem Teil der Peptonwasserröhrchen nach 24 Stunden Cholerakeime nicht mehr isoliert werden konnten, veranlaßte uns in dem nächsten Versuch die zweite Prüfung der Anreicherungsröhrchen schon nach 20 Stunden vorzunehmen. Im übrigen war die Versuchsanordnung dieselbe, nur war der Galle entsprechend dem weiteren Vorschlage Ottolenghis 0,1 ccm KNO_3 zugesetzt, weil dadurch die Anreicherung der Vibrionen noch mehr gefördert werden soll.

Tabelle XIX. 2. Versuch: Mikroskopische Untersuchung im gefärbten Ausstrichpräparat.

Nr.	Mischungsverhältnis der dem Stuhl zugesetzten Bakterien	Galleanreicherung		Peptonwasseranreicherung	
		nach 4 Stunden	nach 20 Stunden	nach 4 Stunden	nach 20 Stunden
1	0,2 ccm Cholera- u. 1 ccm Alkaligenes-Aufschwemmung	Zahlreiche Vibrionen im Gesichtsfeld	Sehr zahlreiche Vibrion. in jedem Gesichtsfeld	Im Gesichtsfeld einz., verstreute Vibrionen	Im Gesichtsfeld einz., verstreute Vibrionen.
2	desgl.	Zahlreiche Vibrionen in jedem Gesichtsfeld	desgl.	desgl.	Zahlreiche Vibrionen im Gesichtsfeld
3	0,1 ccm Cholera- u. 1 ccm Alkaligenes-Aufschwemmung	desgl.	desgl.	Im Gesichtsfeld zahlreiche, verstreute Vibrionen	Im Gesichtsfeld zahlr., in Häufchen liegende Vibrionen
4	desgl.	Vereinzelte, über das Gesichtsfeld verstreute Vibrionen	Äußerst zahlr., in dichten Nestern zusammenliegende Vibrionen	desgl.	desgl.
5	0,05 ccm Cholera- u. 1 ccm Alkaligenes-Aufschwemmung	desgl.	Sehr zahlreiche Vibrionen im Gesichtsfeld	Einz., verstreute Vibrionen im Gesichtsfeld	desgl.
6	desgl.	Ziemlich reichlich Vibrionen im Gesichtsfeld	desgl.	Zahlreiche verstreute Vibrionen im Gesichtsfeld	Einzelne Vibrionen

Tabelle XX.

2. Versuch: Plattenausstriche nach Anreicherung mittels Peptonwasser.

Nr.	Mischungsverhältnis der dem Stuhl zugesetzten Bakterien	Wachstum auf der Agarplatte		Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	
		nach 4 Stunden	nach 20 Stunden	nach 4 Stunden	nach 20 Stunden
1	0,2 ccm Cholera- u. 1 ccm Alkaligenes-Aufschwemmung	Zahlreiche, helle Cholerakolonien, dazwischen vereinzelte, trübe größere Bact. coli-Kolonien	Üppiges Wachstum innig gemischter heller Cholera- u. trüber Alkaligeneskolonien; daneben einzelne größere Kolonien von Bact. coli	Zahlreiche, helle, rauchbraune Cholerakolonien, zwischen diesen, und zum Teil ihnen aufgelagert sehr reichlich kleinere, trübe, dunkelgrüne Kolonien von Alkaligenes	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von innig gemischten, größeren, rauchbraunen Cholera- und kleineren, trüben, grünlich. Alkaligenes-Kolonien
2	desgl.	desgl.	desgl.	desgl.	desgl.
3	0,1 ccm Cholera- u. 1 ccm Alkaligenes Aufschwemmung	21 helle, zarte Cholera-, 3 trübe Coli- und vereinzelte feinste Staphylokokkenkolonien	Sehr zahlreiche verschiedenartige Coli-Kolonien	Zahlreiche, helle, rauchbraune Cholerakolonien, zwischen diesen, und zum Teil ihnen aufgelagert sehr reichlich kleinere, trübe, dunkelgrüne Kolonien von Alkaligenes	Zahlreiche, große, rauchbraune Cholerakolonien, die mit kleineren, trüben, grünlichen Alkaligeneskolonien vermengt sind; ferner einzelne, sehr zarte Staphylokokkenkolonien
4	desgl.	Sehr zahlr. helle, Cholerakolonien, dazwischen vereinzelte, trübe Coli- und sehr kleine Staphylokokkenkolonien	Sehr reichliches Wachstum innig gemischter, heller Cholerakolonien und trüber Alkaligeneskolonien; dazwischen ganz vereinzelte, trübe Kolonien v. Bact. coli	desgl.	desgl.
5	0,05 ccm Cholera- u. 1 ccm Alkaligenes Aufschwemmung	33 helle, zarte, Cholerakolonien und 16 aus 2 verschiedenen Arten bestehende Bact. coli-Kolonien	Reichliches Wachstum von hellen Cholerakolonien, die mit zahlreichen Bact. coli- u. einzelnen Alkaligeneskolonien gemischt sind	Einzelne, verstreute, große, rauchbraune Cholerakolonien; sehr zahlr., kleinere, trübe, grünliche Kolonien von Alkaligenes	Üppiges Wachstum von innig gemischten, zahlreichen, kleinen trüben Alkaligenes- und weniger häufigen großen, rauchbraunen Cholerakolonien

Nr.	Mischungsverhältnis der dem Stuhl zugesetzten Bakterien	Wachstum auf der Agarplatte		Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	
		nach 4 Stunden	nach 20 Stunden	nach 4 Stunden	nach 20 Stunden
6	0,05 ccm Cholera- u. 1 ccm Alkaligenes-Aufschwemmung	44 helle, zarte Cholerakolonien, 8 trübe Bact. coli-Kolonien	Reichl. Entwicklung von dichtgemengt. helleren Cholera- u. trüberen Bact. coli-Kolonien verschiedener Art; ferner einzelne Alkaligeneskolonien	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von kleinen trüben Alkaligeneskolonien, zwischen denen zahlreiche, größere, rauchbraune Cholerakolonien eingestreut sind.	Üppiges Wachstum von innig gemischten, zahlreichen, kleinen trüben Alkaligenes- und weniger häufigen großen, rauchbraunen Cholerakolonien

Tabelle XXI.

2. Versuch: Plattenausstriche nach Anreicherung mittels Galle.

Nr.	Mischungsverhältnis der dem Stuhl zugesetzten Bakterien	Wachstum auf der Agarplatte		Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	
		nach 4 Stunden	nach 20 Stunden	nach 4 Stunden	nach 20 Stunden
1	0,2 ccm Cholera- u. 1 ccm Alkaligenes-Aufschwemmung	18 zarte, durchscheinende Cholerakolonien und 43 Kolonien verschiedener Bakt. coli-Stämme	Zahlreiche, verschiedenartige Kolonien von Bact. coli, dazwischen verstreut weniger zahlreiche Cholerakolonien	72 große, glänzende, rauchbraune Cholerakolonien	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von ziemlich großen, rauchbraunen Cholerakolonien
2	desgl.	Zahlreiche, zarte Cholerakolonien, dazwischen vereinzelte Coli- und noch spärlichere Kokkenkolonien	Üppiges Wachstum von innig miteinander gemischten Kolonien von Cholera und Bact. coli	43 große, glänzende, rauchbraune Cholerakolonien	Sehr reichliche Entwicklung von großen, rauchbraunen Cholerakolonien, denen an verschiedenen Stellen spärliche, dunkelgrüne, trübe, kleinere Alkaligeneskolonien aufgelagert sind
3	0,1 ccm Cholera- u. 1 ccm Alkaligenes-Aufschwemmung	25 helle, zarte Cholera- und 29 Bact. coli-Kolonien verschiedener Art	Sehr zahlreiche helle Cholerakolonien, dazwischen einzelne verschiedenartige Bact. coli-Kolonien, sowie Kolonien von Bac. faec. alcalig.	57 große, glänzende, rauchbraune Cholerakolonien, 6 kleine, gelbe Staphylokokkenkolonien	Sehr üppiges Wachstum in rasenförmiger Anordnung, von ziemlich großen, rauchbraunen Cholerakolonien

Nr.	Mischungsverhältnis der dem Stuhl zugesetzten Bakterien	Wachstum auf der Agarplatte		Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	
		nach 4 Stunden	nach 20 Stunden	nach 4 Stunden	nach 20 Stunden
4	0,1 ccm Cholera- u. 1 ccm Alkaligenes-Aufschwemmung	56 helle, zarte Cholera-, 41 verschiedenartige Bact. coli- und 23 kleine Kokkenkolonien	Sehr reichliche Entwicklung von hellen Cholerakolonien; daneben ganz vereinzelte Kolonien von Bact. coli	66 große, glänzende, rauchbraune Cholerakolonien	Wie unter 3., daneben vereinzelte, kleinere, trübe Bact. coli-Kolonien, die den Cholerakolonien aufgelagert sind
5	0,05 ccm Cholera- u. 1 ccm Alkaligenes-Aufschwemmung	10 helle Cholera-, 21 verschiedenartige Bact. coli- u. einzelne Staphylokokkenkolonien	Sehr zahlreiche, helle Cholerakolonien, zwischen denen einzelne verstreute Bact. coli-Kolonien sich finden	87 große, glänzende, rauchbraune Cholerakolonien	Sehr üpp., rasenförm. Wachstum von rauchbraunen, mittelgroßen Cholerakolonien, zwischen denen einzelne Kokkenkolonien sich finden
6	0,05 ccm Cholera- u. 1 ccm Alkaligenes-Aufschwemmung	21 helle, zarte Cholera- und 43 verschiedenartige Bact. coli-Kolonien	Reichliche Entwicklung von hellen Cholerakolonien, daneben vereinzelte Bact. coli-Kolonien	81 große, glänzende, rauchbraune Cholerakolonien	Sehr üpp., rasenförmiges Wachstum von rauchbraunen, mittelgroßen Cholerakolonien, zwisch. denen einzelne Kokkenkolonien sich finden

Bei diesem Versuch ließen sich bezgl. der Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung keine wesentlichen Unterschiede bei den beiden Anreicherungsreihen feststellen. Ebenso tritt auch bei den Ergebnissen der Plattenausstriche eine Überlegenheit der Galleanreicherungsmethode nicht so ausgesprochen zutage wie in dem vorausgegangenen Versuche.

Nach 4- und 20stündiger Bebrütung der Röhrchen ist mittels der Galle- und der Peptonwasseranreicherung der Choleranachweis auf den Dieudonné-Platten regelmäßig, auf den Agarplatten, von einem Peptonwasserröhrchen abgesehen, ebenfalls in allen Fällen gelungen. Insofern kann allerdings das mit der Gallemethode erzielte Resultat vielleicht als etwas günstiger bezeichnet werden, als hier das Wachstum der Alkaligenesbakterien etwas stärker unterdrückt wurde, als bei den Peptonwasserröhrchen.

Schließlich haben wir noch einen Versuch angestellt, bei welchem den Cholera-Stuhlgemischen an Stelle von Bac. alkaligenes größere Mengen von Bact. coli und von Bac. Paratyphus B (je 1 ccm einer Aufschwemmung von 1 Öse auf 10 ccm NaCl) beigemengt wurden, da nach Angabe Ottolenghis namentlich auch diese Bakterienarten durch Galle besser unterdrückt werden sollten als durch Peptonwasser. Die Versuchsanordnung war sonst dieselbe wie bei dem ersten Versuch, nur war den Galleröhrchen wieder jeweils 0,1 KNO_3 zugesetzt.

Tabelle XXII. 3. Versuch. Mikroskopische Untersuchung im gefärbten Ausstrichpräparat.

Nr.	Mischungsverhältnis der dem Stuhl zugesetzten Bakterien	Galleanreicherung		Peptonwasseranreicherung	
		nach 4 Stunden	nach 24 Stunden	nach 4 Stunden	nach 24 Stunden
1	0,2 ccm Cholera- und 1 ccm Bact. coli und 1 ccm Paratyphus B-Aufschwemmung	Zahlreiche, verstreute Vibrionen im Gesichtsfeld	Einzelne, verstreute Vibrionen im Gesichtsfeld	Sehr zahlreiche Vibrionen im Gesichtsfeld	Nur ganz vereinzelte Vibrionen im Gesichtsfeld
2	desgl.	Eine mäßige Zahl verstreuter Vibrionen im Gesichtsfeld	desgl.	Zahlreiche Vibrionen im Gesichtsfeld	Spärliche, verstreute Vibrionen i. Gesichtsfeld
3	0,1 ccm Cholera- und 1 ccm Bact. coli- und 1 ccm Paratyphus B-Aufschwemmung	Zahlreiche verstreute Vibrionen im Gesichtsfeld	desgl.	Vereinzelte Vibrionen im Gesichtsfeld	Zahlreiche, verstreute Vibrionen in jedem Gesichtsfeld
4	desgl.	desgl.	desgl.	desgl.	In jedem Gesichtsfeld vereinz., verstreute Vibrionen
5	0,05 ccm Cholera- und 1 ccm Bact. coli- und 1 ccm Paratyphus B-Aufschwemmung	Spärliche verstreute Vibrionen im Gesichtsfeld	desgl.	desgl.	desgl. (z. Teil schlecht gefärbt)
6	desgl.	desgl.	desgl.	desgl.	Spärliche, verstreute Vibrionen i. Gesichtsfeld (zum Teil schlecht gefärbt)

Tabelle XXIII.

3. Versuch. Plattenausstriche nach Anreicherung mittels Peptonwasser.

Nr.	Mischungsverhältnis der dem Stuhl zugesetzten Bakterien	Wachstum auf der Agarplatte		Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	
		nach 4 Stunden	nach 24 Stunden	nach 4 Stunden	nach 24 Stunden
1	0,2 ccm Cholera- und 1 ccm Bact. coli- und 1 ccm Paratyphus B-Aufschwemmung	Reichl. Wachstum von verschiedenen Bact. coli-Kolonien, zwisch. denen zahlreiche, zarte Paratyph. B-Kolonien eingestreut liegen	Sehr reichliche Entwicklung von verschiedenartig. Bact. coli-Kolon.	22 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien	—

Nr.	Mischungsverhältnis der dem Stuhl zugesetzten Bakterien	Wachstum auf der Agarplatte		Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	
		nach 4 Stunden	nach 24 Stunden	nach 4 Stunden	nach 24 Stunden
2	0,2 ccm Cholera- und 1 ccm Bact. coli- und 1 ccm Paratyphus B-Aufschwemmung	Reichl. Wachstum von verschiedenen Bact. coli-Kolonien, zwisch. denen zahlreiche, zarte Paratyphus B-Kolonien eingestreut liegen	Zahlreiche verschiedenart. Bact. coli-Kolonien und 2 zarte Paratyph. B-Kolonien	29 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien; daneb. zahlreiche, kleine, saftige, trübe Kolonien von Bact. coli	—
3	0,1 ccm Cholera- und 1 ccm Bact. coli- und 1 ccm Paratyphus B-Aufschwemmung	Reichl. Wachstum von verschiedenartigen Bact. coli-Kolonien; dazwisch. einzelne, zarte Paratyphus B-Kolonien	Reichl. Entwicklung v. verschiedenartigen Bact. coli-Kolonien, die mit zahlreichen, zarten Paratyph. B-Kolonien vermischt sind	28 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien	21 große, rauchbraune, glänzende Cholera-Kolonien
4	desgl.	Sehr zahlreiche, verschiedenartig. Bact. coli-Kolonien u. daneben ebenfalls sehr zahlreich, zarte Paratyphus B-Kolonien	desgl.	32 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien; daneben üppiges Wachstum von kleinen, saftigen, trüben Kolonien von Bact. coli	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von mittelgroßen, rauchbraunen Cholerakolonien
5	0,05 ccm Cholera- und 1 ccm Bact. coli- und 1 ccm Paratyphus B-Aufschwemmung	Zahlreiche, verschiedenartige Bact. coli-Kolonien und vereinzelte, zarte Paratyphus B-Kolonien	desgl.	16 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien; ferner sehr zahlreiche, kleine saftige, trübe Bact. coli-Kolonien	11 große, rauchbraune, glänzende Cholera-Kolonien
6	desgl.	desgl.	Sehr zahlreiche, verschiedenartige Kolonien v. Bact. coli; dazwischen verstreut weniger häufig kleine, zarte Kolonien v. Bact. coli	18 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien und daneben einzelne, kleine, saftige, trübe Kolonien von Bact. coli	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von kleinen, trüben, saftigen Kolonien des Bact. coli

Tabelle XXIV.

3. Versuch: Plattenausstriche nach Anreicherung mittels Galle.

Nr.	Mischungsverhältnis der dem Stuhl zugesetzten Bakterien	Wachstum auf der Agarplatte		Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	
		nach 4 Stunden	nach 24 Stunden	nach 4 Stunden	nach 24 Stunden
1	0,2 ccm Cholera- und 1 ccm Bact. coli- und 1 ccm Paratyphus B-Aufschwemmung	Reichliches Wachstum verschiedenartiger Kolonien von Bact. coli	Sehr reichliche Entwicklung von verschiedenen Bact. coli-Kolonien	Üppiges Wachstum von zieml. großen, rauchbraunen Cholerakolonien	—
2	desgl.	desgl.	desgl.	48 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien neben zahlreichen, trüben, kleinen, saftigen Kolonien von Bact coli	217 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien
3	0,1 ccm Cholera-, 1 ccm Bact. coli-, 1 ccm Paratyph. B-Aufschwemmung	Reichliches Wachstum von verschiedenartig. Bact. coli Kolonien und von zarten, hellen Paratyphus B-Kolonien	Sehr zahlreiche, verschiedenartig. Bact. coli Kolonien	19 große, rauchbraune Cholerakolonien; ferner zahlreiche, kleine, saftige, trübe Kolonien von Bact. coli	—
4	desgl.	Reichliche Entwicklung von verschiedenartigen Bac. coli-Kolonien	desgl.	23 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien	27 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien
5	0,05 ccm Cholera- und 1 ccm Bact. coli- und 1 ccm Paratyphus B	desgl.	Zahlreiche, verschiedenartige Bact. coli Kolonien	8 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien neben zahlreichen, kleinen, trüben saftigen Kolonien von Bact. coli	—
6	desgl.	desgl.	desgl.	45 große, rauchbraune, glänzende Cholerakolonien; ferner vereinzelte, kleine, trübe, saftige Kolonien von Bact. coli	—

Auch bei diesem Versuche ergab die mikroskopische Untersuchung keine Unterschiede zwischen beiden Anreicherungsverfahren.

Infolge der reichlichen Beimengung von Coli- und Paratyphusbakterien zu den Stuhlproben konnte aber bei diesem Versuch weder mit dem Peptonwasser noch mit dem Galleverfahren auf der Agarplatte der Choleranachweis erbracht werden, dagegen kamen auf den nach 4stündiger Bebrütung der Anreicherungsröhrchen angelegten Dieudonné-Platten die Cholerakeime und zwar sowohl aus den Galle- wie aus den Peptonwasserröhrchen in ziemlich gleicher Weise zur Entwicklung. Nach 24stündiger Anreicherung konnten auch mit der Dieudonné-Platte nur noch aus 2 Galle- und aus 3 Peptonwasserröhrchen Cholerakeime herausgezüchtet werden. Bei diesem Versuch ließ sich sonach eine Überlegenheit der Gallemethode gegenüber dem Peptonwasserverfahren nicht feststellen.

Die gesamten Ergebnisse der vergleichenden Versuche über die Leistungsfähigkeit der Galle- und der Peptonwassermethode für die Anreicherung der Cholerakeime lassen sich unseres Erachtens dahin zusammenfassen, daß das Galleverfahren in manchen Fällen vielleicht etwas bessere Ergebnisse liefert als die Peptonwasseranreicherung, daß es der letzteren aber nicht so überlegen ist, daß sich seine ausschließliche Anwendung an deren Stelle empfiehlt, da auch das Peptonwasserverfahren, wie der letzte Versuch zeigte, mitunter noch Erfolg haben kann, wo die Gallemethode versagt. Es erscheint uns für die Praxis vielmehr vorteilhaft beide Verfahren gleichzeitig nebeneinander anzuwenden, da sie sich nach den erhaltenen Versuchsergebnissen gegenseitig ergänzen können. Jedenfalls kann aber auch bei der Galleanreicherung auf eine frühzeitige Untersuchung der Anreicherungsröhrchen nach 4 oder 6 Stunden, was ja auch schon im Interesse einer möglichst frühen Sicherung der Diagnose geboten ist, nicht verzichtet werden.

Literatur.

1. Dieudonné, Zentralbl. f. Bakt. usw. Abt. I, Orig. Bd. 50.
2. Neufeld u. Woithe, Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte Bd. 33.
3. Esch, Deutsche med. Wochenschr., 1910.
4. Pilon, Zentralbl. f. Bakt. Abt. I, Orig. Bd. 60.
5. Ottolenghi, Zentralbl. f. Bakt. usw. Abt. I, Orig. Bd. 58.
6. Heim, Zentralbl. f. Bakt. Bd. 30 u. Deutsche med. Wochenschr., 1907.
7. Huntemüller, Zentralbl. f. Bakt. usw. Abt. I, Orig. Bd. 50.
8. Hachla u. Holobut, Zentralbl. f. Bakt. Bd. 52. — Sineff u. Drosdowitsch, ebd. — Pergola, ebd. Bd. 54 u. Bd. 59. — Tuschinsky, ebd. Bd. 54. — Laubenheimer, ebd. Bd. 52. — Badnikow, Russky Wratsch, 1909. — Bürgers Hyg. Rundschau, 1900. — Stokvis, Nederl. Tijdschr. v. Geneesk., 1910. Münch. med. Wochenschr. 1910. Bull. d. l'Inst. Past., 1910. — Glaser u. Hachla, Zentralbl. Bd. 57. — Weißkopf, Wien. kl. Wochenschr., 1911. — Jacobsen, Zentralbl. Bd. 56.
9. Friedrichs, Deutsche med. Wochenschr., 1911.
10. Sparmberg, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 70. Bernhardt, ebd. Bd. 71.
11. Bärthlein, Berl. klin. Wochenschr., 1912.
12. Pollak, ebd.

Nachtrag.

In einer vor kurzem erschienenen Mitteilung empfiehlt Moldavan[1]), bei Herstellung des Dieudonnéschen Nährbodens Blutalkali und Agar nicht in dem von Dieudonné angegebenen Verhältnis von 3 : 7, sondern von 1 : 4 zu mischen, da bei diesem Mischungsverhältnis die gegossenen Platten bereits nach 6 Stunden, gerade nach Ablauf der ersten Anreicherungsperiode der Cholerastuhlproben in den Peptonwasserröhrchen, gebrauchsfähig seien.

Nach Moldavan ist die Elektivität dieses weniger alkalischen Blutalkaliagars zwar etwas geringer, aber für die Verhältnisse der Praxis vollkommen ausreichend. Auch glaubte Moldavan, daß der Dieudonné-Agar in dem ursprünglichen Mischungsverhältnis doch den für die Entwicklung der Choleravibrionen optimalen Alkaleszenzgrad überschreite, und hält es deshalb für möglich, daß durch Zersetzung der Stuhlproben in ihrer Lebensfähigkeit geschädigte Choleravibrionen diesen hohen Alkaleszenzgrad nicht vertragen und so dem Nachweis entgehen können. Da sich diese neue Modifikation des Blutalkaliagars nach den Angaben Moldavans in Dalmatien bei der Untersuchung von 350 Stuhlproben gut bewährt hat, so haben wir auch mit diesem Nährboden einige Versuche angestellt. Zugleich prüften wir bei diesen Versuchsreihen, die von Kraus, Zecki Zia und v. Zubrzciky[2]) zur Anreicherung der Choleravibrionen empfohlene Blutalkalibouillon. Die erhaltenen Ergebnisse seien hier nachträglich noch angefügt.

Anreicherung von Choleravibrionen in Blutalkalibouillon.

Neufeld und Woithe hatten bereits die elektiven Fähigkeiten des Peptonwassers für Choleravibrionen durch Zusatz verschiedener Mengen der Dieudonnéschen Blutalkalimischung erhöhen können, ebenso günstige Ergebnisse aber auch durch einfachen Alkalizusatz zu den Peptonwasserröhrchen erzielt. Sie empfehlen deshalb in der Praxis zur Anreicherung der Choleravibrionen neben dem gewöhnlich gebräuchlichen auch stark alkalisiertes Peptonwasser anzuwenden. Auch Kraus und seine Mitarbeiter vermochten bei ihren Versuchen durch Zusatz von Alkali und von Blutalkali die elektiven Eigenschaften des Peptonwassers für Choleravibrionen zu steigern, weit bessere Ergebnisse erhielten sie jedoch nach ihren Angaben durch Zusatz bestimmter Mengen von Blutalkali zu lackmusneutraler und schwach alkalischer Bouillon. Allerdings muß bei Verwendung verschiedener Blutalkalilösungen die Menge des der Bouillon zugesetzten Blutalkalis variiert werden, auch hat sich bei den weiteren Versuchen die lackmusneutrale Bouillon besser als die alkalische bewährt. Im allgemeinen empfehlen die Autoren zur Herstellung größerer Mengen des Nährbodens folgendes Vorgehen.

Zu 100 ccm neutraler Bouillon werden 25 ccm Blutalkali zugesetzt. Die offenen Kölbchen bleiben drei Stunden bei 50° und dann 24 Stunden bei 37°. Nach Ab-

[1]) Praktische Ergebnisse der bakteriologischen Cholerauntersuchungen in Dalmatien im Jahre 1911. „Das Österreichische Sanitätswesen 1912, Nr. 8".

[2]) Kraus, Zecki Zia und v. Zubrzciky, Wiener Klinische Wochenschr. 1911, Nr. 30.

füllung der Mischung in Reagenzröhrchen in der Menge von je 5 ccm ist der Nährboden gebrauchsfähig.

Die Versuche wurden von uns in der Weise angestellt, daß je 8 Röhrchen, in welche 5 ccm Blutalkalibouillon, bezw. 10 ccm Peptonwasser eingefüllt waren, mit je 1 ccm Stuhl und 0,5 ccm einer Aufschwemmung von Bac. faec. alkalig. (1 Öse auf 20 ccm destilliertes Wasser) beschickt wurden. Den Röhrehen wurden außerdem fallende Mengen — von 0,2 bis 0,025 ccm einer Choleraaufschwemmung (1 Öse auf 50 ccm destilliertes Wasser) in der Weise zugefügt, daß jeweils zwei Röhrchen sowohl der Peptonwasser- wie der Blutalkalibouillonreihe 0,2, 0,1, 0,05 oder 0,025 ccm der Choleraaufschwemmung enthielten. Nach 5- und nach 12 stündiger Bebrütung bei 37° wurde aus jedem Röhrchen je eine Agar- und eine Dieudonné-Platte angelegt. In den Tabellen XXV und XXVI ist das ausführliche Protokoll eines derartigen Versuchs wiedergegeben.

Tabelle XXV.

1. Versuch: Plattenausstrich nach Anreicherung mittels Peptonwassers.

Nummer	Mischungsverhältnis der dem Stuhl zugesetzten Bakterien	Wachstum auf der Agarplatte		Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	
		nach 5 Stunden	nach 12 Stunden	nach 5 Stunden	nach 12 Stunden
1	0,2 ccm Cholera- und 0,5 ccm Alkaligenes-Aufschwemmung	Sehr zahlreiche, verschiedenartige Kolonien von Bact. coli; dazwischen vereinz. Kokken-Kolonien	Sehr zahlreiche, innig gemischte, verschiedenart. Bact. coli-Kolonien	47 große, rauchbraune Cholerakolonien, ferner zahlreichere, helle, zentral weißlich getrübte Bact. coli-Kolonien	Üppiges Wachstum v. weißgrauen, trüben Bact. coli-Kolonien; ferner 1 große, helle, rauchbraune Cholerakolonie
2	desgl.	Reichliches Wachstum von verschiedenartigen Bact. coli-Kolonien, zwischen denen vereinzelt Cholera- u. Alkaligeneskolonien eingestreut sind	desgl., am Rande d. Platte ferner Rasen zerfließender Bac. proteus-Kolonien	Sehr zahlreiche, große, rauchbraune Cholerakolonien; daneb. vereinzelte, zentral weißlich getrübte Bact. coli-Kolonien	Sehr zahlreiche, weißlichgraue, trübe Bact. coli-Kolonien; zwisch. denen häufig eingestreute, helle, rauchbraune Cholerakolonien liegen
3	0,1 ccm Cholera- und 0,5 ccm Alkaligenes-Aufschwemmung	Sehr zahlreiche Kolonien von Bact. coli verschiedener Art; ganz vereinzelt Alkaligenes-Kolonien	Reichliches Wachstum verschiedenartiger Bact. coli-Kolonien	31 große, rauchbraune Cholerakolonien und etwa ebenso viele, helle, zentral weißlich getrübte Bact. coli-Kolonien	Reichliches Wachstum von weißlichgrauen, trüben Bact. coli-Kolonien, zwischen denen zahlreiche, helle, rauchbraune Cholerakolonien sich finden

Nummer	Mischungsverhältnis der dem Stuhl zugesetzten Bakterien	Wachstum auf der Agarplatte		Wachstum auf dem Dieudonné-schen Nährboden	
		nach 5 Stunden	nach 12 Stunden	nach 5 Stunden	nach 12 Stunden
4	0,1 ccm Cholera- und 0,5 ccm Alkaligenes-Aufschwemmung	Reichliches Wachstum von verschiedenen Bact. coli-Kolonien, zwischen denen sich verstreute Kokkenkolonien finden	Reichliches Wachstum verschiedenartiger Bact. coli-Kolonien	1 Cholerakolonie, zahlreiche, äußerst feine Diplokokkenkolonien	Sehr zahlreiche, weißgraue, trübe Bact. coli-Kolonien, ferner vereinzelte, helle, durchscheinende Diplokokkenkolonien
5	0,05 ccm Cholera- und 0,5 ccm Alkaligenes-Aufschwemmung	desgl.	Sehr zahlreiche, innig gemischte, verschiedenart. Bact. coli-Kolonien, die häufig von dichten Rasen zerfließender Bac. proteus-Kolonien umsäumt sind	Zahlreiche, rauchbraune Cholera- u. vereinzelte, grünlichgraue Alkaligenes-Kolonien	Reichliches Wachstum von weißlichgrauen Bact. coli-Kolonien, zwischen denen verschiedentlich, meist sektorenförmig angefügt, sich helle, rauchbraune Cholerakolonien finden
6	desgl.	Sehr zahlreiche, verschiedenartige Kolonien von Bact. coli; dazwischen vereinzelte Alkaligenes-Kolonien	Reichliches Wachstum verschiedenartiger Bact. coli-Kolonien	11 große, rauchbraune Cholera-, 9 helle, zentral getrübte Bact. coli-Kolonien, ferner zahlreiche, feinste Diplokokkenkolonien	Sehr zahlreiche, weißlichgraue Bact. coli-Kolonien, vereinz., helle, durchscheinende, zerfließende Bac. proteus-Kolonien
7	0,025 ccm Cholera- und 0,5 ccm Alkaligenes-Aufschwemmung	Reichliches Wachstum von verschiedenen Bact. coli-Kolonien	desgl., daneben einzelne, zerfließende Bac. proteus-Kolonien	Sehr zahlreiche, helle, zentral getrübte Bact. coli-Kolonien, dazwischen vereinzelte, große, rauchbraune Cholerakolonien	Sehr zahlreiche, weißlichgraue, glänzende Bact. coli-Kolonien, zwischen denen vereinzelte, helle, rauchbraune Cholerakolonien sich finden
8	desgl.	desgl., dazwischen vereinzelte Alkaligenes-Kolonien	desgl.	39 große, rauchbraune Cholerakolonien, daneben 41 weißlichgraue Bact. coli-Kolonien	desgl.

Tabelle XXVI.

1. Versuch: Plattenausstrich nach Anreicherung mittels Blutalkalibouillon von Kraus.

Nummer	Mischungsverhältnis der dem Stuhl zugesetzten Bakterien	Wachstum auf der Agarplatte		Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	
		nach 5 Stunden	nach 12 Stunden	nach 5 Stunden	nach 12 Stunden
1	0,2 ccm Cholera- und 0,5 ccm Alkaligenes-Aufschwemmung	Sehr zahlreiche, helle, durchscheinende Cholerakolonien; daneben weniger häufig Alkaligenes- und vereinzelte Bact. coli-Kolonien	Zahlreiche, helle Cholera und verschiedenartige Bact. coli-Kolonien, die zum Teil in einem Rasen von Bac. Proteus-Kolonien eingebettet erscheinen; ferner vereinzelte Alkaligenes-Kolonien	Sehr zahlreiche, helle, rauchbraune Cholerakolonien; daneben ganz vereinzelte, grünlichbraune, trübe Alkaligenes-Kolonien	Reichliches Wachstum von Bac. proteus- und hellen, zentral getrübten Bact. coli-Kolonien, zwischen denen sich zahlreiche, rauchbraune Cholerakolonien befinden
2	desgl.	desgl.	desgl.	Reichliches Wachstum von hellen, rauchbraunen Cholerakolonien; daneben vereinzelte trübe, weißgraue Bact. coli- und Alkaligenes-Kolonien	desgl.
3	0,1 ccm Cholera- und 0,5 ccm Alkaligenes-Aufschwemmung	Sehr zahlreiche, helle, durchscheinende Cholera- und verschiedene Bact. coli-Kolonien; dazwischen vereinzelte Alkaligenes-Kolonien	Reichliches Wachstum innig gemischter, verschiedenartiger Bact. coli- und zerfließender Bac. proteus-Kolonien, zwischen denen vereinzelte, helle Cholerakolonien liegen	Sehr zahlreiche, helle, rauchbraune Cholerakolonien, dazwischen verstreut und häufig sektorenförmig angefügt trübe, weißgraue Bact. coli-Kolonien	Sehr zahlreiche, helle, trübe Bact. coli-, bezw. Bac. proteus-Kolonien und dazwischen häufig sektorenartig eingefügt zahlreiche, helle, rauchbraune Cholerakolonien
4	desgl.	desgl.	desgl.	desgl.	Reichliches Wachstum von hellen, rauchbraunen Cholera- und etwas kleineren, weißlich-grauen Bact. coli-, bezw. Bac. proteus-Kolonien

Nummer	Mischungsverhältnis der dem Stuhl zugesetzten Bakterien	Wachstum der Agarplatte		Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	
		nach 5 Stunden	nach 12 Stunden	nach 5 Stunden	nach 12 Stunden
5	0,05 ccm Cholera- und 0,5 ccm Alkaligenes-Aufschwemmung	Reichhaltiges Wachstum verschiedener Bact. coli-Kolonien; dazwischen verstreut helle, durchscheinende Cholera- und vereinzelte Alkaligenes-Kolonien	Sehr zahlreiche, verschiedenartige Bact. coli-Kolonien, zwischen denen sich häufig helle Cholerakolonien finden. Ferner am Rande der Platte, sowie die anderen Kolonien umsäumend, Rasen zerfließender Bac. proteus-Kolonien	Reichliches Wachstum von hellen, rauchbraunen Cholerakolonien, dazwischen verstreut weißgraue Bact. coli-, bezw. grünlichgraue Alkaligenes-Kolonien	Üppiges Wachstum von hellen, weißlich grauen, großen Bact. coli-Kolonien, zwischen denen verschiedentlich helle, rauchbraune Cholerakolonien sich finden
6	desgl.	Sehr zahlreiche, verschiedene Bact. coli- und weniger häufig Alkaligenes Kolonien; vereinzelte, helle Cholerakolonien	Reichliches Wachstum verschiedenartiger Bact. coli-Kolonien; dazwischen ganz vereinzelt helle Cholerakolonien	desgl.	Sehr zahlreiche, helle, weißlichgraue Bact. coli-Kolonien, zwischen denen zahlreiche helle, rauchbraune Cholerakolonien liegen
7	0,025 ccm Cholera- und 0,5 ccm Alkaligenes Aufschwemmung	Sehr reichliche, stark miteinander vermischte, verschiedenartige Bact. coli-, ferner helle Cholera- und irisierende Alkaligenes-Kolonien	Reichliches Wachstum innig gemischter, verschiedenartiger Bact. coli-Kolonien; daneben ganz vereinzelte, helle Cholerakolonien. Am Rande dichte Rasen zerfließender Bac. proteus-Kolonien	Sehr zahlreiche, helle, rauchbraune Cholerakolonien, zwischen denen häufig eingestreut trübe, weiß-graue Bact. coli-Kolonien liegen	Sehr zahlreiche, trübe, weißlichgraue Bact. coli-Kolonien, dazwischen verschiedentlich, meist sektorenartig angefügt, helle, rauchbraune Cholerakolonien
8	desgl.	Verstreute, einzelne Diplokokkenkolonien	Sehr zahlreiche, verschiedenartige Bact. coli-Kolonien dazwischen ganz vereinzelte, helle Cholerakolonien	desgl.	Reichliches Wachstum von trüben, weißgrauen Bact. coli- und hellen, durchscheinenden Bac. proteus-Kolonien; dazwischen vereinzelt rauchbraune, große Cholerakolonien

Aus den mitgeteilten Protokollen geht eindeutig hervor, daß mit dem neuen Anreicherungsverfahren mittels Blutalkalibouillon in der Tat ganz erheblich viel bessere Ergebnisse erhalten werden wie durch die gewöhnliche Peptonwasseranreicherungsmethode.

Aus jedem Blutalkalibouillonröhrchen gelang der Choleranachweis ohne Schwierigkeit, und zwar waren in jedem Falle nicht nur auf den Dieudonné-Platten, sondern auch auf den Agarplatten Cholerakolonien zur Entwicklung gekommen. Wesentlich ungünstiger liegen die Verhältnisse bei der Peptonwasseranreicherung.

Es konnte zwar auch hier nach 5 Stunden aus jedem Röhrchen Cholera herausgezüchtet werden, aber nur mittels der Dieudonné-Platte, und nach 12 Stunden war es selbst mit diesem Nährboden nicht mehr möglich, aus je einem 0,1 ccm, bezw. 0,05 ccm Choleraaufschwemmung enthaltenden Röhrchen Cholera zu isolieren. Auf den Agarplatten gelang der Choleranachweis überhaupt nur einmal nach 5 Stunden aus einem der beiden, mit der größten Choleramenge beschickten Peptonwasserröhrchen.

Einige weitere, in ähnlicher Weise durchgeführte, vergleichende Versuchsreihen führten zu entsprechenden Ergebnissen und ließen ebenso eindeutig die Überlegenheit des neuen Anreicherungsverfahrens erkennen, so daß auf eine ausführliche Wiedergabe dieser Versuchsprotokolle verzichtet werden kann.

Anderseits hat aber die Blutalkalibouillonanreicherung auch bei zwei von uns vorgenommenen Versuchen vollkommen versagt, indem alle sowohl nach 5- wie nach 12stündiger Bebrütung bei 37° aus den Blutalkalibouillonröhrchen angelegten Agar- und Dieudonné-Platten vollkommen steril blieben. In beiden Fällen war die Blutalkalibouillon in derselben Weise wie auch bei den günstig ausgefallenen Versuchen hergestellt worden. Man muß sonach auch bei der Blutalkalibouillon ähnlich wie bei dem Blutalkaliagar nach Neufeld und Woithe damit rechnen, daß der Nährboden in einzelnen Fällen nicht nur die Entwicklung der anderen Bakterien, sondern auch die der Choleravibrionen vollständig unterdrücken kann. Um vor derartigen Fehlschlägen geschützt zu sein, ist es deshalb notwendig, in der Praxis nur solche Blutalkalibouillon zu benutzen, deren Brauchbarkeit zuvor erprobt war.

Auch Kraus und seine Mitarbeiter haben diese Forderung schon aufgestellt.

Da die notwendige Vorprüfung der Blutalkalibouillon wie auch ihre Herstellung an sich schon längere Zeit in Anspruch nimmt, so wird man bei den ersten Choleraerkrankungen diese Anreicherungsmethode kaum zur Anwendung bringen können.

Bei den weiteren Cholerafällen wie bei den anschließenden Bazillenträgeruntersuchungen wird es sich aber u. E. durchaus empfehlen, von ihr wegen ihrer dem Peptonwasserverfahren überlegenen Leistungsfähigkeit regelmäßig Gebrauch zu machen.

Versuche mit der von Moldavan empfohlenen Modifikation des Blutalkaliagars.

In einer größeren Versuchsreihe haben wir zunächst unter Benutzung von 32 Stuhlproben diesen Nährboden im Vergleich mit dem Dieudonnéschen Originalagar auf seine wachstumshemmende Eigenschaft gegenüber Stuhlbakterien geprüft. Wie bei den entsprechenden Versuchen mit den anderen Nährböden wurden die Platten wieder jeweils mit einer großen Öse der Stuhlproben beimpft. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle XXVII zusammengestellt.

Tabelle XXVII.

Nummer des Stuhles	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Moldavan modifizierten Nährboden
Stuhl Nr. 1	Spärliches Wachstum äußerst feiner, zarter, durchscheinender Kolonien von Diplokokken.	Wie Dieudonné.
Stuhl Nr. 2	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von saftigen, weißlichgrünen, mittelgroßen Kolonien, die sich aus sehr kurzen, feinen Stäbchen zusammensetzen = Di. 1.	Steril.
Stuhl Nr. 3	Sehr reichliche Entwicklung von kleinen, zarten, weißlichgrünen, teils helleren, teils trüberen Kolonien, die von sehr kurzen, feinen, meist schwach gekrümmten Stäbchen gebildet werden = Di. 2.	Spärliche, äußerst feine, durchscheinende Kolonien von Diplokokken.
Stuhl Nr. 4	Vereinzelte, äußerst feine, durchscheinende Kolonien von Diplokokken.	Steril.
Stuhl Nr. 5	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von kleinen, weißlich-grünen, teils helleren, teils trüben, saftigen Kolonien, die aus kurzen, feinen, bezw. dicken Stäbchen bestehen = Di. 3.	Spärliche, äußerst feine, durchscheinende Kolonien von Diplokokken.
Stuhl Nr. 6	1. Sehr reichliche Entwicklung äußerst feiner, zarter, durchscheinend. Kolonien v. Diplokokken. 2. Dazwischen vereinzelte, ziemlich große, rauchbraune, choleraähnliche Kolonien, die sich aus kürzeren oder längeren, zu Fadenbildung neigenden, meist schwach gekrümmten, schlanken Stäbchen zusammensetzen = Di. 4.	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von mittelgroßen, graugrünlichen, trüben Kolonien, die von sehr kurzen, mitteldicken, geraden Stäbchen gebildet werden = M. 1.
Stuhl Nr. 7	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von grünlich-grauen, trüben, kleinen Kolonien, die von meist kurzen, mitteldicken, geraden Stäbchen gebildet werden = Di. 5.	Wie Dieudonné = M. 2.
Stuhl Nr. 8	Zahlreiche, teils helle, durchscheinende, rauchbraune, teils trübe, grauweißliche Kolonien, die aus kurzen, schlanken, feinen Stäbchen, bezw. aus sehr kurzen, dicken, plumpen, bipolar gefärbten Bakterien bestehen = Di. 6.	Vereinzelte, äußerst feine, durchscheinende Kolonien von Diplokokken.
Stuhl Nr. 9	1. Üppiges, rasenförmiges Wachstum von innig gemischten, teils hellen, zarten, durchscheinenden, teils trüben, graugrünlichen, mittelgroßen Kolonien, die sich aus kurzen, feinen, schlanken Stäbchen, bezw. aus sehr kurzen, dicken, plumpen Bazillen zusammensetzen = Di. 7. 2. Dazwischen eingestreute, stark zerfließende, glänzende Kolonien, die aus kurzen, mitteldicken Stäbchen bestehen = Di. 8.	Reichliche Entwicklung von kleinen, stark zerfließenden, glänzenden Kolonien, die von sehr kurzen, mitteldicken, geraden Stäbchen gebildet werden = M. 3.
Stuhl Nr. 10	Sehr zahlreiche, kleine, helle, durchscheinende Kolonien, die sich aus kurzen, feinen, schlanken Stäbchen zusammensetzen (= Di. 9a), und denen wiederum kleine, trübe, mattgraue Kolonien reichlich aufgelagert sind, die von kurzen, dicken, plumpen Bazillen gebildet werden = Di. 9b.	Reichliches Wachstum von innig gemischten, teils hellen, durchscheinenden, teils trüben, zentral milchig getrübten, kleinen Kolonien, die aus kurzen, schlanken, bezw. kurzen, dicken, plumpen Stäbchen bestehen = M. 4a u. b.

Nummer des Stuhles	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Moldavan modifizierten Nährboden
Stuhl Nr. 11	Zahlreiche, sehr feine, durchscheinende Kolonien, die aus kurzen, mitteldicken Stäbchen bestehen = Di. 10.	Spärliche, äußerst feine, durch scheinende Kolonien v. Diplokokken.
Stuhl Nr. 12	Vereinzelte, äußerst zarte, durchscheinende Kolonien von Diplokokken.	Wie Dieudonné.
Stuhl Nr. 13	Steril.	Steril.
Stuhl Nr. 14	Zahlreiche, äußerst feine, durchscheinende Diplokokkenkolonien, denen vereinzelte, mittelgroße, rauchbraune Kolonien aufgelagert sind, die von kurzen, mitteldicken, zum Teil schwach gekrümmten Stäbchen gebildet werden = Di. 11.	Wie Dieudonné = M. 5.
Stuhl Nr. 15	Ziemlich reichliche, sehr feine, durchscheinende Kolonien von Diplokokken.	1. Zahlr., äußerst feine, durchscheinende Diplokokkenkolonien. 2. 18 dazwischen eingestreute, größere, trüb-rauchbraune Kolonien, die sich aus kurzen, mitteldicken, zieml. geraden Stäbchen zusammensetzen = M. 6.
Stuhl Nr. 16	Spärliche, äußerst feine, durchscheinende Diplokokkenkolonien.	Wie Dieudonné.
Stuhl Nr. 17	Vereinzelte, kleine, rauchbraune Kolonien, die aus kurzen, mitteldicken, zum Teil schwach gekrümmten Stäbchen bestehen = Di. 12.	Wie Dieudonné = M. 7.
Stuhl Nr. 18	Vereinzelte, äußerst feine, durchscheinende Diplokokkenkolonien.	Wie Dieudonné.
Stuhl Nr. 19	Sehr zahlreiche, feinste, durchscheinende Kolonien von Diplokokken.	Zahlreiche, kleine, zarte, graugrünliche Kolonien, die von kurzen, ziemlich dicken, meist schwach gekrümmten Stäbchen gebildet werden = M. 8.
Stuhl Nr. 20	Steril.	Zahlreiche, saftige, zentral milchig getrübte, mittelgroße Kolonien, die aus kurzen, mitteldicken, vereinzelt schwach gekrümmten Stäbchen sich zusammensetzen = M. 9.
Stuhl Nr. 21	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von zarten, durchscheinenden, choleraähnlichen Kolonien, die bei auffallendem Licht einen grünlichen Schimmer zeigen und von langen, schlanken, meist schwach gekrümmten und häufig zu Fadenbildung neigenden Stäbchen gebildet werden = Di. 13.	Steril.

Nummer des Stuhles	Wachstum auf dem Dieudonnéschen Nährboden	Wachstum auf dem nach Moldavan modifizierten Nährboden
Stuhl Nr. 22	Sehr zahlreiche, feinste, zentral milchig getrübte, glänzende Kolonien von Diplokokken.	Steril.
Stuhl Nr. 23	1. Reichliches Wachstum von zarten, rauchbraunen, durchscheinenden choleraähnlichen Kolonien, die von kurzen, ziemlich dicken, zum Teil schwach gekrümmten Stäbchen gebildet werden = Di. 14. 2. Daneben zahlreiche, große, trübe, graubraune Kolonien, die aus kokkenähnlichen, dicken, plumpen Stäbchen bestehen, die häufig zu zweien zusammenhängen und keulenförmige Bazillen mit meist wenig gefärbter Spitze darstellen = Di. 15. 3. Dazwischen eingestreut noch zahlreiche, kleine, zentral milchig getrübte, weißgrünliche Kolonien, die aus sehr kurzen, plumpen Stäbchen sich zusammensetzen = Di. 16.	Steril.
Stuhl Nr. 24	Zahlreiche, äußerst feine, punktförmige Kolonien von Diplokokken.	Wie Dieudonné.
Stuhl Nr. 25	Steril.	Steril.
Stuhl Nr. 26	Üppiges, rasenförmiges Wachstum von kleinen, hellgrauen, glänzenden, saftigen Kolonien, die aus teils sehr kurzen teils längeren, mitteldicken, geraden Stäbchen bestehen = Di. 17.	Zahlreiche, kleine, hellgraue, saftige Kolonien, die von sehr kurzen, feinen Stäbchen gebildet werden = M. 10.
Stuhl Nr. 27	Reichliche Entwicklung von feinen, hellgrauen, saftigen Kolonien, die sich aus sehr kurzen, mitteldicken Stäbchen zusammensetzen = Di. 18.	Wie Dieudonné = M. 11.
Stuhl Nr. 28	Sehr zahlreiche, äußerst feine, punktförmige Kolonien von Diplokokken.	Wie Dieudonné.
Stuhl Nr. 29	Vereinzelte, äußerst feine, punktförmige Kolonien von Diplokokken.	desgl.
Stuhl Nr. 30	Steril.	Steril.
Stuhl Nr. 31	Spärliche, äußerst feine, punktförmige Kolonien von Diplokokken.	Wie Dieudonné.
Stuhl Nr. 32	desgl.	desgl.

Bei diesen Versuchen hatte die Moldavansche Modifikation keine schwächere, sondern vielmehr eine deutlich stärkere, entwicklungshemmende Wirkung auf die Stuhlbakterien ausgeübt als der Dieudonnésche Originalagar. Von den 32 untersuchten Stuhlproben wurde auf den Platten des nach Moldavan modifizierten Nährbodens bei 8 oder bei 25 %, auf den Dieudonné-Platten nur bei 4 oder bei 12,5 % das Wachstum der Stuhlbakterien vollständig unterdrückt. Rechnet man auch bei dieser Versuchsreihe die Platten, auf denen nur Kokken zum Wachstum gekommen waren,

deren Entwicklung für den Choleranachweis nicht störend gewesen wäre, den steril gebliebenen Platten zu, so wurden die übrigen Stuhlkeime auf den Platten nach Moldavan bei 21 Stuhlproben oder in 65 %, auf den Dieudonné-Platten bei 16 Stuhlproben oder in 50 % der Fälle vollständig gehemmt. Was die Art der zur Entwicklung gekommenen Stuhlbakterien anlangt, so konnten in dieser Versuchsreihe insgesamt 5 Proteus-, 3 Coli- und 2 Alkaligenes-Stämme von den Moldavan-Platten gezüchtet werden.

Weniger günstige Ergebnisse als bei den Untersuchungen über die wachstumshemmenden Eigenschaften des Nährbodens gegenüber den Stuhlbakterien erhielten wir nun aber, als wir das Wachstum einer größeren Anzahl von Cholerareinkulturen und von Kulturen choleraähnlicher Vibrionen auf der von Moldavan angegebenen Modifikation prüften. Wir hatten zu diesen Versuchen 20 Cholera- und 17 choleraähnliche Vibrionenstämme herangezogen, um festzustellen, ob bei dem von Moldavan angegebenen Mischungsverhältnis des Blutalkaliagars bereits 6 Stunden nach dem Ausgießen der Platten alle Cholera- und Vibrionenstämme auf diesen gleichmäßig gutes Wachstum zeigen würden. Bei den in dieser Hinsicht angestellten Versuchsreihen machten wir nun wiederholt die Erfahrung, daß dies keineswegs der Fall ist. Verschiedentlich sahen wir, daß einzelne Cholera- wie auch einzelne Vibrionenstämme auf den 6 Stunden nach dem Ausgießen beimpften Moldavan-Platten innerhalb 24 Stunden überhaupt nicht zur Entwicklung gekommen waren, während auf anderen gleichzeitig mit demselben Blutalkaliagargemisch gegossenen Platten derselben Versuchsreihe die übrigen Cholera- und Vibrionenstämme üppiges Wachstum aufwiesen. Da die Entwicklungshemmung nicht regelmäßig dieselben Kulturen betraf, sondern sich in den einzelnen Versuchsreihen auf verschiedene Stämme erstreckte, so läßt sich diese Beobachtung wohl nur so erklären, daß auch bei dem von Moldavan angegebenen Mischungsverhältnis des Blutalkaliagars bei einzelnen Platten einer Ausgußserie nach 6 Stunden die wachstumshemmende Wirkung des Nährbodens gelegentlich doch noch so groß sein kann, daß auch Cholera und Vibrionen an ihrer Entwicklung verhindert werden können. Es handelt sich allerdings nur um Ausnahmefälle, da nur in wenigen Versuchsreihen einzelne Platten in dieser Weise ausfielen. Jedenfalls wird man aber auch bei diesem Mischungsverhältnis des Blutalkaliagars ein Versagen einzelner Platten, bei ihrer Beimpfung 6 Stunden nach dem Ausgießen, nicht mit absoluter Sicherheit ausschließen können. Der Nährboden zeigt in dieser Hinsicht eine gewisse Ähnlichkeit mit dem Verhalten der Neufeld-Woitheschen Modifikation und dürfte auch bezüglich der Verwendung in der Praxis wie diese zu beurteilen sein.

Über Mutationserscheinungen bei Bakterien.

Von

Dr. med. Baerthlein,

Oberarzt im Königl. bayr. 18. Inf.-Rgt., kommandiert zum Kaiserl. Gesundheitsamte.

(Hierzu Tafel IV—XI.)

In früheren Arbeiten (1) hatte ich bei einer Reihe pathogener und nicht pathogener Bakterien über eigenartige Wachstumserscheinungen berichtet, welche von mir als Mutationsvorgänge angesprochen wurden und sich hauptsächlich darin äußerten, daß die einzelnen Kulturen auf der Agarplatte verschiedenartige, wohl charakterisierte, voneinander aber völlig abweichende Kolonieformen bildeten, die sich wieder jeweils aus bestimmten, in morphologischer Hinsicht differenten Bakterien zusammensetzten. Bei isolierter Abimpfung von den verschiedenartigen Kolonien desselben Stammes gelang es dann, voneinander verschiedene Kulturen zu züchten und getrennt weiterzuerhalten, die bei regelmäßiger Weiterimpfung in konstanter Weise ausschließlich nur in der einen oder anderen Kolonieform auf der Agarplatte wuchsen mit gleichzeitiger Beibehaltung der für die betreffende Kolonienart charakteristischen, morphologischen Eigenschaften der einzelnen Bakterien. Es hatte sich dabei dann weiterhin gezeigt, daß die Mutationsformen bei den einzelnen Bakterienarten verschieden sind, im allgemeinen aber für eine Bakterienart, wenn auch bei einzelnen derselben mehrere Mutationsgruppen vorkommen, jeweils doch konstante Verhältnisse bieten, so daß aus dem Aussehen der mutierten Kolonien in gewissem Sinne schon in vielen Fällen auf die Art des betreffenden Bakterienstammes geschlossen werden kann.

Die Untersuchungen sind inzwischen von mir in dem von Herrn Regierungsrat Prof. Dr. Haendel geleiteten Laboratorium weiter fortgeführt und insbesondere auch auf das serologische Verhalten der verschiedenen Mutationsformen ausgedehnt worden. Nachfolgend soll nun über die gesamten bisher von mir auf diesem neuen Gebiete erzielten Ergebnisse unter Beifügung der ausführlichen Protokolle und einer Reihe erläuternder und erklärender Abbildungen berichtet werden. Wie bereits erwähnt, konnten derartige Mutationserscheinungen bei all den verschiedenen, bisher von mir untersuchten Bakterienarten festgestellt werden, so daß die eigenartigen Vorgänge anscheinend bei allen Bakterien zu beobachten sein dürften. Es sollen daher im folgenden die einzelnen Bakteriengruppen, soweit sie bisher von mir untersucht wurden, zunächst gesondert besprochen werden.

I. Cholera.

Bei Cholera sind von mir die ersten derartigen Beobachtungen gemacht worden. Es handelte sich dabei um die von den Spandauer Fällen herrührenden frisch isolierten Cholerakulturen: Chol. Heubeck, Chol. Sarnow I, II und III, sowie um Chol. Behrens, die ich auf etwaige hämolytische Eigenschaften prüfte. Dabei war es mir aufgefallen, daß die genannten Stämme auf der Agarplatte ziemlich gleichmäßig teils in hellen, durchsichtigen, teils in gelbweißen, undurchsichtigen Kolonien wuchsen. Übereinstimmend ließ sich bei allen Kulturen in morphologischer Hinsicht feststellen, daß die hellen Kolonien aus schlanken, zarten, gleichmäßig gefärbten, gut gekrümmten Stäbchen sich zusammensetzten, während die gelben Kolonien entweder aus kurzen, plumpen, bipolar gefärbten Vibrionen bestanden oder aus längeren, ebenfalls gut gekrümmten Bazillen, die dann aber eine auffallend segmentierte Färbung zeigten. Als ich bei den einzelnen Kulturen von je einer gelben, bezw. hellen Kolonie besondere Stämme anlegte und diese regelmäßig in kurzen Zwischenräumen von Agar zu Agar weiterimpfte, ergab sich, daß die gelben Stämme nur gelbe, die hellen nur helle Kolonien bildeten.

Unterschiede in der Kolonienbildung der Choleravibrionen auf der Gelatineplatte, das Auftreten von atypischen, trüben Kolonien auf derselben sind schon lange bekannt, und bei der Bedeutung, welche früher der Gelatineplatte für die Choleradiagnose zukam, von vielen Autoren, so von Koch, Gaffky (2), Petri, Friedrich (4), Kruse (5), Kolle (3) u. a., eingehend beschrieben worden. Kossel und Kolle (3) berichten ausführlich über einen Cholerastamm (Chol. VI), der ebenfalls auf Gelatine helle und trübe Kolonien bildete, und bei dem sie sowohl aus den hellen wie aus den trüben Kolonien je einen besonderen hellen, bezw. trüben Stamm isolieren konnten; der erstere wuchs auf Gelatineplatten größtenteils in hellen, der letztere in trüben Kolonien. Morphologische Differenzen zwischen den Bakterien der verschiedenen Kolonien werden nicht erwähnt.

Kruse (5) beobachtete bei einem Cholerastamm nach längerem Aufenthalt in Brunnenwasser und bei sehr alten Cholerakulturen ebenfalls auf der Gelatineplatte verschiedene Kolonienbildung. Bei der ersteren Kultur zeigten die Vibrionen der verschiedenen Kolonien auch morphologische Unterschiede. Besonders bemerkenswert ist die Angabe von Kruse, daß die auf Gelatine atypisch wachsenden Cholerastämme ihre Eigenart erst infolge zahlreicher Meerschweinchenpassagen verloren und sich nur auf diesem Wege zum alten Typus zurückführen ließen. Ferner berichtet Kolle (3), daß „man bei Aussaat von Reinkulturen der echten Choleravibrionen auf Agar zwei Arten von Kolonien, homogene und solche, welche eine deutliche Randbildung oder Ringbildung aufweisen", beobachten könne. Versuche, ob es gelingt, von diesen verschiedenartigen Kolonien differente Stämme derselben Kultur isoliert zu gewinnen und weiter zu züchten, sind jedoch nicht gemacht worden. Ebenso liegen keine Angaben vor über das morphologische Verhalten der Vibrionen, aus denen sich jeweils die differenten Kolonien zusammensetzten.

Bei meinen Untersuchungen hatte ich zunächst den Eindruck, als ob es sich bei den verschiedenartigen Kolonien auf der Agarplatte um Cholerakulturen handeln

würde, die durch Bacterium coli oder durch Kokken verunreinigt seien. Allein die morphologische, kulturelle und serologische Prüfung ergab mit Sicherheit den Nachweis, daß die so stark differenten Kolonien sämtlich aus echten Choleravibrionen bestanden. Ich dachte dann weiterhin an die Möglichkeit, daß bei den einzelnen Kulturen der Spandauer Fälle jeweils zwei verschiedene, in kultureller und morphologischer Hinsicht stark voneinander abweichende Varietäten von Cholerastämmen vorliegen könnten, zumal es sich um Kulturen handelte, die von einer eng begrenzten Epidemie herrührten. In gewissem Sinne sprach auch der Umstand dafür, daß die von den differenten Kolonien angelegten Stämme bei mehrwöchiger, täglich erfolgender Weiterzüchtung auf Agar, ferner trotz mehrfacher, in kurzen Zwischenräumen vorgenommener Überimpfung in Peptonwasserröhrchen, bezw. auf dem Dieudonnéschen Blutalkaliagar und endlich trotz wiederholter Tierpassage stets dieselben differenten Eigenschaften regelmäßig beibehielten. Es entwickelten sich bei den hellen Stämmen immer nur helle und aus den gelben stets gelbe Kolonien, deren Vibrionen auch in morphologischer Hinsicht die vorstehend geschilderten morphologischen Abweichungen zeigten. Wenn eine Mischkultur aus beiden Vibrionenarten Meerschweinchen injiziert wurde, so wuchsen auf der mit dem Herzblut der verendeten Tiere geimpften Agarplatte beide Formen von Kolonien. Was das weitere kulturelle Verhalten sowie die Beeinflussung bei den biologischen Immunitätsreaktionen betrifft, so zeigten gelbe und helle Stämme abgesehen von ihrem hämolytischen Verhalten, das später noch behandelt werden soll, keine nennenswerten Differenzen. Auf Gelatine wuchsen sie im allgemeinen in den für Cholera charakteristischen Kolonien unter mehr oder weniger ausgeprägter Verflüssigung des Nährbodens; auf dem Drigalskischen Lackmus-Milchzuckeragar entwickeln sie zarte, flache, tiefblaue Scheiben, und auf dem Dieudonnéschen Blutalkaliagar bilden beide Stämme gleichartige, durchscheinende, zarte Kolonien. Die Beweglichkeit war in der Regel bei beiden Arten gleich gut. Durch ein Cholera-Eselserum vom Titer 1 : 10000, das mittels der Kultur Chol. 74 vir. hergestellt worden war, wurden sie rasch bis zur Titergrenze, einzelne sowohl der hellen wie der gelben Stämme sogar in noch schwächeren Verdünnungen agglutiniert. Im Pfeifferschen Versuch zeigten beide Arten bei Verwendung eines mit Chol. 74 vir. gewonnenen, bakteriziden Cholera-Kaninchenserums (Titer 0,0002) bereits nach wenigen Minuten vollständige Granulabildung, während die Kontrolltiere innerhalb 24 Stunden eingingen.

Die Annahme, daß hier jeweils zwei verschiedene Stämme bei demselben Krankheitsfall vorgelegen hätten, mußte indessen fallen gelassen werden, weil plötzlich bei meinen hellen und gelben Passagestämmen der Spandauer Fälle, wenn die Kulturen längere Zeit hindurch nicht weiter geimpft wurden, bei Ausstrichen auf der Agarplatte wieder beide Arten von Kolonien auftraten in der Weise, daß bei dem hellen wie bei dem gelben Stamme außer den entsprechenden auch vereinzelte Kolonien der anderen Form wuchsen. Dazu kam noch der Umstand, daß ich bei einer anderen, frisch isolierten Cholerakultur, die von einem Fall in Freiburg a. d. E. stammte, auf der Agarplatte ebenfalls helle, durchsichtige und gelbweiße, undurchsichtige Kolonien erzielte, die sich auch wieder aus morphologisch entsprechend differenten

Vibrionen zusammensetzten. Als ich dann weiterhin eine Anzahl älterer Agarröhrchen, die mit älteren und jüngeren Laboratoriumsstämmen beimpft waren, nach dieser Richtung hin untersuchte, zeigten fast alle der geprüften Cholera- und El Tor-Kulturen die gleichen auffallenden Wachstumserscheinungen. Diese Beobachtungen sprechen eindeutig dafür, daß diese eigenartigen Wachstumsvorgänge als mutationsähnliche Erscheinungen aufzufassen sind, zumal es sich herausstellte, daß sich sowohl aus allen gelben wie allen hellen Cholerastämmen nach längerem Stehen der Kulturröhrchen bei Ausstrichen auf der Agarplatte plötzlich auch wieder Vibrionenkolonien der anderen Art entwickelten.

Bei den ersten Untersuchungen war ich natürlich bestrebt, von sogenannten Einzellkulturen auszugehen, und ich versuchte auch verschiedentlich mit Hilfe des Burrischen (6) Tuscheverfahrens Einzellkulturen von Choleravibrionen zu gewinnen, aber der Erfolg war im Gegensatz zu anderen Bakterien bei den Cholerastämmen stets negativ. Es mag daher von Interesse sein, an dieser Stelle über die zur Aufklärung der Fehlschläge vorgenommenen Untersuchungen im folgenden kurz zu berichten.

Ich stellte mir von einer Anzahl Cholerakulturen und von einem choleraähnlichen Vibrionenstamm physiologische Kochsalzaufschwemmungen von $^1/_{100\,000}$, bezw. $^1/_{1000\,000}$ Öse her und impfte davon jeweils 2 Ösen in Reagenzröhrchen, die je 1 ccm im Verhältnis von 1 : 10 verdünnter, sterilisierter Grüblerscher Tusche, bezw. 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung enthielten. Aus den im Brutschrank bei 37° gehaltenen Röhrchen wurden weiterhin nach $^1/_2$ Stunde, ebenso nach 2 und schließlich nach 24 Stunden Ausstriche auf Agarplatten vorgenommen, und die innerhalb 24 Stunden auf dem festen Nährboden gewachsenen Kolonien gezählt. Wie in Tabelle 1 übersichtlich zusammengestellt ist, ergab es sich, daß nach 2 Stunden in allen Röhrchen sowohl der Tuscheaufschwemmung wie der Kochsalzlösung eine starke Abnahme der Vibrionen eingetreten war, und zwar in der Kochsalzlösung noch in höherem Maße. Nach 24 Stunden erwiesen sich sämtliche Röhrchen mit Kochsalzlösung vollkommen steril, die Tuscheröhrchen dagegen zeigten mit einer Ausnahme sämtlich eine reichliche Entwickelung von Kommabazillen. Aus diesem Versuch dürfte hervorgehen, daß die Tusche an und für sich, vermutlich weil sie als Bindesubstanz für die Farbstoffpartikelchen noch eine leimartige Substanz enthält und so den Bakterien ein gewisses Nährmedium bietet, auf Cholera- und ähnliche Vibrionen nicht in dem Maße schädigend einwirkte, daß die Anwendung des Burrischen Tuscheverfahrens als aussichtslos erscheint. Ich suchte nun bei dem weiteren Vorgehen dem Tuschepunktverfahren möglichst ähnliche Verhältnisse für die Entwickelung der Choleravibrionen zu gewinnen und brachte auf sterile, halbierte Deckgläschen jeweils einen Tropfen aus den verdünnte Tusche enthaltenden Reagenzröhrchen, die vorher mit Cholerabazillen aus Kochsalzaufschwemmungen beimpft worden waren. Gleichzeitig wurde zur Kontrolle des Keimgehaltes je ein Tröpfchen aus diesen tuschehaltigen Reagenzgläschen auf Agarplatten ausgestrichen. Sobald dann die Tusche auf den unter einer sterilen Glasglocke gehaltenen Deckgläschen eintrocknete, was im allgemeinen nach ungefähr 20 Minuten der Fall war, wurden die Deckgläschen in Bouillonröhrchen gebracht und das Ganze in den Brutschrank von 37° gegeben. Während bei dem oben erwähnten,

sofort angelegten Tuscheausstrich auf der Agarplatte überall reichliche Koloniebildung sich einstellte, blieben, wie die Tabelle 2 erkennen läßt, die nach 24, bezw. 48 Stunden aus den deckgläschenhaltigen Bouillonröhrchen beimpften Agarplatten vollkommen steril; es waren also sämtliche Vibrionen bei dieser Versuchsanordnung abgestorben. Die Ursache dieser Erscheinung dürfte einerseits in dem schädigenden Einfluß der Tusche selbst, anderseits vor allem in der nachteiligen Einwirkung der Eintrocknung zu suchen sein.

Tabelle 1.

Nr.	Bezeichnung der Kultur	Alter des keimhaltigen Gemisches	Verdünnung 1 : 100000 Zahl der Kolonien		Verdünnung 1 : 1000000 Zahl der Kolonien	
			bei Tusche	bei Kochsalzlösung	bei Tusche	bei Kochsalzlösung
1	Chol. Ruhleb.	½ Stunde	71	17	7	28
		2 Stunden	2	0	3	0
		24 „	∞	0	∞	0
2	Chol. Ch. . .	½ Stunde	9	7	0	27
		2 Stunden	1	0	0	0
		24 „	∞	0	∞	0
3	Chol. H gelb	½ Stunde	409	425	36	169
		2 Stunden	227	2	30	2
		24 „	∞	0	∞	0
4	Chol. H hell	½ Stunde	29	100	12	8
		2 Stunden	7	0	4	0
		24 Stunden	∞	0	∞	0
5	Chol. 74 vir.	½ Stunde	34	15	19	6
		2 Stunden	0	0	1	0
		24 „	0	0	7	0
6	Vibrio Metschnikoff	½ Stunde	1	19	2	3
		2 Stunden	0	2	0	0
		24 „	162	0	0	0

Tabelle 2.

Nr.	Bezeichnung der Kultur	Zahl der Kolonien bei frischem Tuscheausstrich auf Agar	Wachstum in den Bouillonröhrchen, geprüft auf der Agarplatte	
			nach 24 Stunden	nach 48 Stunden
1	Chol. H hell . . .	228	0	0
2	Chol. H gelb . . .	594	0	0
3	Chol. 74 vir. hell . .	138	0	0
4	Chol. Kulm hell . .	sehr zahlreich (über 1000)	0	0
5	El Tor 2	409	0	einige Kokkenkolonien
6	Chol. 94 hell . . .	743	0	0

Im übrigen hat der weitere Gang der Untersuchungen die sog. Einzellkulturen als notwendigen Ausgangspunkt entbehrlich erscheinen lassen, da die Mutationserscheinungen

bei mehr als 40 Cholerakulturen der Laboratoriumssammlung allerdings neben einzelnen Ausnahmen wie Chol. 3 vir. übereinstimmend nachgewiesen werden konnten, ferner bei anderen Bakterien wie Typhus und Ruhr die Darstellung von Einzellkulturen gelungen ist, und bei solchen auf diesem Wege gewonnenen Stämmen Mutationserscheinungen in eben derselben Weise wie bei den gewöhnlichen Kulturen sich feststellen ließen.

Wie bereits erwähnt, gelang es ohne weiteres, helle und gelbe Stämme getrennt zu erhalten und fortzuzüchten; Voraussetzung war dabei nur, daß sie regelmäßig in kurzen Zwischenräumen weitergeimpft wurden. Ich legte mir nun von den zwei verschiedenen Vibrionenstämmen der Cholera Heubeck, von denen ich sicher war, daß sie trotz vielwöchiger Weiterimpfung auf Agar, bezw. trotz wiederholter Tierpassage immer gleichmäßig nur gelbe, bezw. helle Kolonien entwickelten, zwei Agarröhrchen an und machte jeden 2. Tag Ausstriche davon auf Agarplatten. Es zeigte sich, daß dann nach 22 Tagen bei der Impfung aus dem Röhrchen des gelben Stammes auf der Agarplatte neben den zahlreichen gelben Kolonien zum erstenmal plötzlich auch vereinzelt helle wuchsen. Einige Tage später, als das Röhrchen des hellen Stammes 28 Tage alt war, machte sich die entsprechende Erscheinung bei dem hellen Stamm bemerkbar, indem jetzt auch hier auf der Agarplatte neben zahlreichen hellen vereinzelte gelbe Kolonien auftraten. In beiden Fällen wiesen die differenten Kolonien dann auch die bereits erwähnten morphologischen Unterschiede der Vibrionen auf. Diese Beobachtung spricht meines Erachtens dafür, daß infolge von Änderungen, bezw. Störungen der Lebensbedingungen der Vibrionen die mutationsähnlichen Erscheinungen einsetzen. Daß speziell die frischen Cholerakulturen dem Wechsel der Ernährungsverhältnisse gegenüber meist recht empfindlich sind, und daß dadurch leicht Änderungen im morphologischen und agglutinatorischen Verhalten hervorgerufen werden können, wurde schon von Haendel und Woithe (7) betont.

Im Laufe der weiteren Untersuchungen ist es mir dann gelungen, außer den bereits skizzierten zwei Kolonienarten bei den meisten daraufhin beobachteten Cholerakulturen und zwar sowohl bei frisch isolierten wie bei älteren Laboratoriumsstämmen noch eine dritte Form, nämlich die von Kolle bereits beschriebene Ringform, auf der Agarplatte zu isolieren und wochenlang getrennt fortzuzüchten. Wie in den Abbildungen 1, 2 und 3 der Tafel IV schematisch festgehalten ist, können also bei mutierenden Cholerastämmen demnach eventuell drei verschiedene Kolonienarten auf der Agarplatte auftreten: 1. die für Cholera als charakteristisch geltenden, hellen, durchscheinenden, bläulich schimmernden Kolonien (Figur 1), 2. gelbweiße, undurchsichtige, in ihrem Wachstum an Bacterium coli erinnernde (Figur 2) und 3. die Ringformen, die aus einem gelbweißen, undurchsichtigen Zentrum und einer hellen Randzone bestehen und im allgemeinen weniger häufig als die beiden anderen Arten auftreten. Den Unterschieden in der Kolonieform entsprechen, wie schon kurz bemerkt, weitgehende morphologische Differenzen der Vibrionen, aus denen sich jeweils die einzelnen Kolonien zusammensetzen. Wir sehen an den auf Grund von Mikrophotogrammen hergestellten, schematischen Abbildungen der Tafel V, daß z. B. die hellen, durchscheinenden Kolonien der Chol. Freiburg sich aus schlanken, zarten, gut gekrümmten und gleichmäßig ge-

färbten Stäbchen von mittlerer Länge (Figur Ia) zusammensetzen, während die gelbweißen, undurchsichtigen Kolonien aus kurzen, dicken, plumpen, bipolar gefärbten, ebenfalls gut gekrümmten Bazillen (Figur Ib) bestehen. Bei anderen Cholerakulturen, die sich wie die in den Figuren IIa und b beispielsweise dargestellten Mutationsformen von Chol. 74 vir. aus länger wachsenden Individuen zusammensetzen, erscheinen die Vibrionen der hellen Kolonienart als lange, schlanke, gut gekrümmte, gleichmäßig gefärbte Stäbchen, diejenigen der gelben, Bacterium coli ähnlichen Kolonien als lange, dicke, gut gekrümmte, segmentiert gefärbte Bakterien. Es sei noch erwähnt, daß, um vollständig gleiche färberische Bedingungen für die einzelnen Vibrionenarten zu erreichen, bei der Herstellung der gefärbten Präparate jeweils die verschiedenen Varietäten einer Cholerakultur auf einem und demselben Objektträger nebeneinander aufgetragen und gleichzeitig gefärbt wurden. Die Vibrionen der ringförmigen Kolonien stehen, was Morphologie und färberisches Verhalten betrifft, denjenigen der hellwachsenden Art sehr nahe: sie sind, wie aus Figur Ic der Tafel V z. B. bei Chol. Freiburg schon ersichtlich ist, ebenfalls schlanke, gut gekrümmte, gleichmäßig gefärbte Stäbchen; dabei ist es gleichgültig, ob das Untersuchungsmaterial aus dem gelbweißen Zentrum oder aus den hellen Randpartien entnommen wird. Als ich dann von der zentralen, gelben Partie, bezw. von dem hellen Hof der ringförmigen Kolonien verschiedentlich auf Agarplatte überimpfte, entwickelten sich dementsprechend auf sämtlichen Nährböden stets wieder die gleichen, charakteristischen, ringförmigen Kolonien.

Ich legte mir nun, wie ich dies bereits früher bei der hellen und bei der gelben Art einer Cholerakultur getan hatte, ein Agarröhrchen von der ringbildenden Varietät an, nachdem diese längere Zeit hindurch fortgezüchtet worden war, ohne daß die Kolonieform sich geändert hatte, und impfte aus diesem Röhrchen in regelmäßigen, kurzen Zwischenräumen, um zu sehen, ob sich auch bei dieser Art nach einiger Zeit mutationsartige Erscheinungen geltend machten. In der Tat wuchsen, nachdem das Agarröhrchen etwa 6 Wochen gestanden hatte, bei der Aussaat auf der Agarplatte plötzlich neben sehr zahlreichen ringförmigen Kolonien auch vereinzelte helle, die bei der Weiterimpfung stets wieder nur helle, durchscheinende Kolonieformen entwickelten.

Was das kulturelle Verhalten der verschiedenen Varietäten auf den anderen Nährböden angeht, so habe ich bisher auf den einzelnen festen Nährmedien wie z. B. auf Lackmus-Laktose-Agar von Drigalski, auf dem Dieudonnéschen Blutalkaliagar im Aussehen der Kolonien bei den 3 Choleravibrionenarten keine nennenswerten Differenzen erzielen können. Man beobachtet zwar gelegentlich bei einzelnen Kulturen, daß auf der Lackmus-Laktose-Agarplatte die verschiedenen Mutationsarten geringe Unterschiede im Farbenton der Kolonien und in deren Größe aufweisen; aber diese Differenzen finden sich nicht regelmäßig bei der Mehrzahl der Stämme und sind nur bei sehr sorgfältiger Betrachtung zu erkennen.

Anders aber ist es hinsichtlich des morphologischen Verhaltens der einzelnen Vibrionen. Die auffallenden morphologischen Unterschiede zwischen den einzelnen mutierten Arten bleiben auch auf den anderen Nährböden, und zwar sowohl in

flüssigen wie in festen Nährmedien z. B. Peptonwasser und Bouillon deutlich erhalten. Bei der Rückimpfung traten dann auf den Agarplatten ebenfalls wieder die entsprechenden Kolonieformen des Ausgangsmaterials zutage. Auch bei längerer Zeit hindurch erfolgender Tierpassage behalten die getrennt isolierten Typen ihre besondere Koloniebildung auf der Agarplatte und ihre morphologischen Eigentümlichkeiten bei. Ebensowenig wurden diese Wachstumsvorgänge durch die Beschaffenheit des Agars beeinflußt, von dem im Laufe der Untersuchungen zahlreiche, verschiedene Sorten zugleich unter Varierung des Alkaleszenzgrades benutzt wurden; dabei war es auch, wie ich dies schon früher hervorgehoben habe, gleichgültig, ob die zur Herstellung des Agarnährbodens verwendete Bouillon von Rindfleisch, Pferdefleisch oder Liebig's Fleischextrakt gewonnen worden war.

Was speziell das Wachstum der hellen und der gelben Kolonien von Choleravibrionen auf der Gelatineplatte betrifft, so habe ich schon an anderer Stelle erwähnt, daß die beiden Varietäten des Freiburger Stammes, bezw. der Spandauer Cholerakulturen hinsichtlich der Beschaffenheit der Kolonien im allgemeinen keine Differenzen aufwiesen und in der für Cholera charakteristisch angegebenen Weise wuchsen. Es schien nun angezeigt, noch an einer größeren Zahl von Cholerastämmen die verschiedenen Vibrionenformen in ihrem Verhalten auf der Gelatineplatte nachzuprüfen.

Tabelle 3. Wachstum auf der Gelatineplatte.

Nr.	Bezeichnung der Kultur	helle Varietät	gelbe Varietät
1	Chol. H. . . .	helle, lichtbrechende, typische Kolonien	helle, lichtbrechende, typische Kolonien
2	Chol. Freiburg .	„	„
3	Chol. 228 . . .	„	„
4	Chol. 231 . .	„	„
5	Chol. 234 . . .	„	helle, lichtbrechende Kolonien mit Schlingenbildung am Rande, aufgefasert
6	Chol. Ruhleb. .	„	„
7	Chol. Baku . .	helle, lichtbrechende Kolonien mit Schlingenbildung am Rande	„
8	Chol. 74 vir. . .	helle, lichtbrechende, typische Kolonien	helle, lichtbrechende, typische Kolonien
9	Chol. 94 . . .	helle u. dunkle Kolonien	helle und dunkle Kolonien
10	Chol. Kulm . .	helle, lichtbrechende, typische Kolonien	helle, lichtbrechende, typische Kolonien
11	Chol. Ch. . . .	„	„
12	Chol. G. . . .	„	„
13	Chol. 00 . . .	„	„
14	Chol. Ostpreußen	„	„
15	Chol. El Tor 2 .	„	„
16	Chol. El Tor 3 .	„	„
17	Chol. El Tor 4 .	„	„
18	Chol. 6	„	„

Die diesbezüglichen Untersuchungen, deren Ergebnis in Tabelle 3 zusammengefaßt ist, zeigen, daß sich bei der Mehrzahl der geprüften Cholerastämme und zwar in der gleichen Weise bei den hellen wie bei den gelben Varietäten auf der Gelatineplatte helle, lichtbrechende Kolonien entwickeln. Einzelne Kulturen bilden atypische Kolonien, z. B. Chol. Baku hell und gelb, Chol. Ruhleb. gelb, indem eine ausgesprochene Schlingenbildung nach Art eines Medusenhauptes die Kolonien kennzeichnet. Beachtenswert erscheint der Umstand, daß Chol. 94 sowohl bei der hellen wie bei der gelben Art auf der Gelatineplatte zugleich in Form der für die Gelatineplatte schon beschriebenen charakteristischen hellen und der atypischen trüben Kolonien wächst, ferner, daß der Cholerastamm VI des Laboratoriums (von dem Kossel und Kolle (3) helle und dunkle Kolonien auf der Gelatineplatte isolieren und getrennt weiter züchten konnten) bei der hellen wie bei der gelben Varietät in wiederholten Versuchen jetzt nur lichtbrechende, helle Kolonien entwickelte. Während also in bezug auf die Beschaffenheit und das Aussehen der Kolonien sich keine besonderen Differenzen zwischen den verschiedenen Varietäten eines Cholerastammes auf der Gelatineplatte feststellen lassen, bleiben die charakteristischen, morphologischen Unterschiede zwischen den einzelnen Vibrionengruppen vollständig auch bei den Gelatineplattenkolonien erhalten, einerlei, ob es sich um helle oder dunkle Gelatineplattenkolonien handelt. Impft man weiterhin von der Gelatineplatte wieder auf Agarplatten über, so treten auch die bekannten Differenzen bei den Kolonien selbst entsprechend dem Ausgangsmaterial wieder auf, ohne Rücksicht darauf, ob man bei der Rückimpfung auf Agar helle oder dunkle Gelatineplattenkolonien verwendet.

Von Interesse schien es weiterhin, das kulturelle Verhalten der Mutationsformen in verschiedenen, bei der Typhus-Differentialdiagnose benutzten Nährmedien zu untersuchen. Ich prüfte daher das Wachstum einer Anzahl von Cholerakulturen in Lackmusmolke, Barsiekow I und II (Lackmus-Nutrose-Zuckerlösungen), Löffler I und II (Malachitgrün-Nutrose-Pepton-Zuckerlösungen) und Hetsch (Lackmus-Nutrose-Mannitlösung).

Aus Tabelle 4 (S. 442), in der das Resultat zusammengestellt ist, ersehen wir, daß bei den letztgenannten 5 Nährböden zwischen den einzelnen Varietäten eines Stammes abgesehen von geringen quantitativen Schwankungen sich keine besonderen Unterschiede geltend machten, während hinsichtlich der Lackmusmolke — das Ergebnis wurde nach 5tägiger Beobachtung aufgenommen — verschiedentlich zwischen den Mutationsformen einer Kultur sowohl wie zwischen den verschiedenen Stämmen selbst sich Abweichungen zeigten. Wir finden bei einer Anzahl von Stämmen eine intensive Rötung der Lackmusmolke und zwar vorwiegend bei der hellen Art der Cholerakulturen und im Gegensatz dazu bei anderen eine tiefe Blauviolettfärbung. Bei der Prüfung der Röhrchen auf Reinheit der Kulturen nach Abschluß des Versuches durch Ausstriche auf Agarplatten stellte sich dann heraus, daß bei einem Teil der rot gefärbten Reagenzröhrchen die Vibrionen abgestorben, in den übrigen nur spärlich vorhanden waren, ferner daß in den letztgenannten sowie in den auf der Agarplatte reichlich Kolonien bildenden, blaugefärbten Lackmusröhrchen-Kulturen die Mutationsvorgänge wieder sich geltend machten.

Tabelle 4.

Beobachtungsdauer: 5 Tage.

Nummer	Bezeichnung der Kultur	Lackmusmolke	Barsiekow I	Barsiekow II	Löffler I	Löffler II	Hetsch
1	Chol. Freiburg hell	tiefe Blauviolettfärbung u. Trübung	Rötung und starke Trübung	Aufhellung, so daß am oberen Rand nur noch $^1/_2$ cm breiter bläulicher Ring besteht, Trübung	geringe Aufhellung	vollständige Aufhellung u. Trübung	Rötung und Trübung
	„ gelb	desgl.	desgl.	desgl.	desgl.	desgl.	desgl.
2	Chol. H. hell	starke Rötung und leichte Trübung	„	„	„	geringe Entfärbung und Trübung	„
	„ gelb	desgl.	„	„	„		„
3	Chol. Ruhl. hell	„	„	Rötung und Trübung	„	fast vollständige Aufhellung und Trübung	„
	„ gelb	tiefe Blauviolettfärbung u. Trübung	„	fast vollständige Aufhellung wie 1	„	desgl.	Rötung und geringe Trübung
4	Chol. 74 vir. hell	starke Rötung und leichte Trübung	Rötung und Trübung	desgl.	„	„	desgl.
	„ gelb	tiefe Blauviolettfärbung	Rötung und starke Trübung	„	„	„	„
5	Chol. Ch. hell	Rötung und Trübung	desgl.	„	„	vollständige Aufhellung u. Trübung	schwache Rötung und Trübung
	„ gelb	Aufhellung bis zur Rosafärbung und Trübung	„	„	„	desgl.	schwache Rötung, beinahe gänzliche Entfärbung u. Trübung
6	Chol. 94 hell	Rötung und geringe Trübung	„	„	„	„	Rötung und Trübung
	„ gelb	desgl.	„	„	„	„	schwache Rötung und Trübung

Prüfung des hämolytischen Verhaltens.

Bei früheren Gelegenheiten (8) hatte ich schon auf die Tatsache aufmerksam gemacht, daß bei den schwachhämolytisch wirkenden Spandauer und Freiburger Cholerakulturen nur die gelbe Mutationsart Blut zu lösen vermag und zwar sowohl in flüssigen Nährmedien wie auf sehr dünn gegossenen Hammelblutagarplatten. Um nun festzustellen, ob vielleicht diesem auffallenden Verhalten der gelb wachsenden Vibrionen gegenüber den hellen derselben Kultur hinsichtlich des Hämolysierungsvermögens eine gewisse Gesetzmäßigkeit zugrunde liegen könnte, machte ich nach dieser Richtung eingehende Untersuchungen bei einer größeren Anzahl von Cholera-

stämmen und zog zu dieser Prüfung in erster Linie die Cholerakulturen heran, welche bei früheren Untersuchungen von Neufeld, Haendel (9), Woithe (7) und von mir ein wechselndes Hämolysierungsvermögen gezeigt hatten. Die Technik war die gleiche wie bei früheren Versuchen; es wurde jeweils $^1/_5$ Öse der betreffenden Cholerakultur in 1 ccm physiol. Kochsalzlösung verrieben und zu dieser Bakterienaufschwemmung, nachdem vorher daraus noch die Hammelblutagarplatten beimpft worden waren, 5 ccm einer frisch bereiteten, 5%igen Hammelblutkörperchenaufschwemmung zugesetzt. Die Bluiröhrchen kamen dann in den Brutschrank von 37° und wurden nach Abschluß des Versuches durch Überimpfen auf Agarplatten hinsichtlich der Reinheit der Kulturen geprüft.

Tabelle 5.

Nr.	Bezeichnung der Kultur	Ergebnis nach 5 % Hammelblutkörperchenaufschwemmung.			Ergebnis nach 10 % Hammelblutagarplatte.	
		24 Stunden	48 Stunden	72 Stunden	24 Stunden	48 Stunden
1	Chol. Ch. hell	0	0	0	0	0
	„ gelb	0	lebhaft beginnende Lysis	fortschreitend	0	breite Aufhellungszone
2	Chol. Baku hell	0	0	0	0	0
	„ gelb	0	beginnende Lysis	fortschreitend	0	schmale Aufhellungszone
3	Chol. 6 hell	0	0	0	0	0
	„ gelb	beginnende Lysis	fortschreitend	fast komplette Lysis	0	breite Aufhellungszone
4	Chol. 94 hell	0	0	0	0	0
	„ gelb	0	beginnende Lysis	fortschreitend	0	schmale Aufhellungszone
5	Chol. 00 hell	0	0	0	0	0
	„ gelb	0	beginnende Lysis	fortschreitend	0	schmale Aufhellungszone
6	Chol. F. hell	0	0	0	0	0
	„ gelb	0	beginnende Lysis	fortschreitend	0	an einzelnen Stellen breite Aufhellungszone
7	Chol. G. hell	0	0	0	0	0
	„ gelb	0	beginnende Lysis	fortschreitend	0	schmale Aufhellungszone
8	Chol. Rußl. 2 hell	0	0	0	0	0
	„ gelb	0	beginnende Lysis	fortschreitend	0	schmale Aufhellungszone
9	Chol. Frbg. hell	0	0	0	0	0
	„ gelb	0	beginnende Lysis	fortschreitend	0	schmale Aufhellungszone
10	Chol. 231 hell	0	0	0	0	0
	„ gelb	0	0	beginnende Lysis	0	an einzelnen Stellen schmale Aufhellungszone
11	Chol. 232 hell	0	0	0	0	0
	„ gelb	beginnende Lysis	fortschreitende Lysis	lebhaft fortschreitd. Lysis	0	schmale Aufhellungszone

Nr.	Bezeichnung der Kultur	5 % Hammelblutkörperchenaufschwemmung. Ergebnis nach			10 % Hammelblutagarplatte. Ergebnis nach	
		24 Stunden	48 Stunden	72 Stunden	24 Stunden	48 Stunden
12	Chol. 237 hell	0	0	0	0	0
	„ gelb	0	beginnende Lysis	fortschreitend	0	breite Aufhellungszone
13	Chol. H. hell	0	0	0	0	0
	„ gelb	beginnende Lysis	fortschreitend	fortschreitend	0	breite Aufhellungszone
14	Chol. S I hell	0	0	0	0	0
	„ gelb	beginnende Lysis	fortschreitend	fortschreitend	0	breite Aufhellungszone
15	Chol. S II hell	0	0	0	0	0
	„ gelb	beginnende Lysis	fortschreitend	fortschreitend	0	breite Aufhellungszone
16	Chol. S III hell	0	0	0	0	0
	„ gelb	beginnende Lysis	fortschreitend	fortschreitend	0	breite Aufhellungszone
17	Chol. L. hell	0	0	0	0	0
	„ gelb	beginnende Lysis	fortschreitend	fortschreitend	0	breite Aufhellungszone
18	Chol. 230 hell	0	0	0	0	0
	„ gelb	beginnende Lysis	fortschreitend	fortschreitend	0	an einzelnen Stellen Aufhellung
19	Chol. 234 hell	0	0	0	0	0
	„ gelb	beginnende Lysis	fortschreitend	fortschreitend	0	an einzelnen Stellen Aufhellung
20	NaCl	0	0	0		

Wie aus dem in Tabelle 5 niedergelegtem Ergebnis hervorgeht, zeigen sämtliche 19 untersuchten Cholerastämme bei ihrer gelben Varietät eine gewisse, wenn auch geringgradige Hämolyse, die in den Blutkörperchenaufschwemmungen vielfach schon nach 24 Stunden Bebrütung deutlich erkennbar ist. Was die Hämolyse auf den festen Blutnährböden betrifft, zu deren Herstellung gewöhnlich jeweils 10—12 ccm eines 10%igen Hammelblutagars für eine Platte verwendet wurden, so war diese trotz des dünngegossenen Nährbodens in keinem Fall innerhalb 24 Stunden sichtbar. Auch nach 48 Stunden fanden sich noch bei einer Anzahl von Platten nur an einzelnen Stellen, wo der Blutnährboden den geringsten Durchmesser besaß und die Kolonien dicht gedrängt beisammen lagen, diffuse, komplette Aufhellungsbezirke, wie die Abbildung 1 der Tafel VI deutlich erkennen läßt. Im Gegensatz dazu zeigt Figur 2 der gleichen Tafel die Kolonieentwicklung der nichthämolytischen, hellen Varietät des gleichen Stammes auf der Hammelblutplatte und Abbildung 3 diejenige einer stark blutlösenden Cholerakultur, bei welcher sich um jede einzelne Kolonie innerhalb 24 Stunden breite, ringförmige Aufhellungszonen einstellen.

Nachdem auf Grund der bisherigen Untersuchungen das differente Verhalten der hellen, bezw. gelben Art von schwach blutlösenden Cholerakulturen anscheinend eine gewisse Regelmäßigkeit aufweist, könnte vielleicht das früher schon beschriebene

Wechseln des Hämolysierungsvermögens bei den genannten Kulturen zum Teil in der Weise erklärt werden, daß bei den früheren Untersuchungen bald die helle, bald die gelbe Varietät dieser Stämme in überwiegendem Maße vertreten gewesen ist und so bald einen negativen, bald einen positiven Ausfall der Prüfung herbeigeführt hat. Von Interesse schien es ferner, zu beobachten, ob sich auch bei den stark hämolytischen Cholerakulturen ein ähnlicher Unterschied zwischen hell und gelb wachsenden Vibrionenkolonien in bezug auf das Hämolysierungsvermögen nachweisen ließe. Wie ich in der Arbeit: „Über das hämolytische Verhalten von Cholera- und El Torstämmen" (8) gezeigt habe, kann man bei Verwendung der Blutkörperchen-Aufschwemmung im Gegensatz zur Blut-Platte schon einen geringen Grad der Hämolyse, bezw. ihren Beginn deutlich erkennen; ich benutzte daher zur Prüfung des Hämolysierungsvermögens der einzelnen Mutationsarten von stark blutlösenden Cholerastämmen nur die flüssigen Nährböden. Auch bei diesen Kulturen tritt übereinstimmend, wie in Tabelle 6 zusammengestellt ist, eine wesentliche Differenz im hämolytischen Verhalten zugunsten der gelben Varietät zutage: Die Hämolyse ist in den mit gelb wachsenden Vibrionen beimpften Röhrchen bereits zu einer Zeit deutlich ausgeprägt, wo in den Blutaufschwemmungen der hellen Varietät noch keine Spur von Blutauflösung zu erkennen ist. Entsprechend wird auch in den Blutröhrchen, welche die gelbe Kolonien bildenden Vibrionen enthalten, komplette Hämolyse früher beobachtet als in denen, welche mit Vibrionen der hellen Art beimpft sind. Bei Chol. Kulm machte sich zwar nach 3 Stunden auch in den Blutaufschwemmungen der hellen Varietät schon der Beginn der Hämolyse bemerkbar, bei der gelbwachsenden Vibrionenart war aber um diese Zeit schon erheblich stärkere Blutauflösung eingetreten.

Tabelle 6. 5% Hammelblutkörperchenaufschwemmung.

Nr.	Bezeichnung der Kultur	Ergebnis nach			
		3 Stunden	6 Stunden	18 Stunden	24 Stunden
1	Chol. 74 vir. hell	0	schwach beginnende Lysis	starke Lysis	komplette Lysis
	„ gelb	beginnende Lysis	lebhaft fortschreitende Lysis	komplette Lysis	„
2	Chol. Ruhl hell	0	beginnende Lysis	fast komplette Lysis	„
	„ gelb	beginnende Lysis	starke Lysis	komplette Lysis	„
3	Chol. Kulm hell	„	„	„	„
	„ gelb	starke Lysis	komplette Lysis	„	„
4	El Tor 2 hell	0	beginnende Lysis	starke Lysis	„
	„ gelb	beginnende Lysis	starke Lysis	komplette Lysis	„
5	El Tor 3 hell	0	beginnende Lysis	fast komplette Lysis	„
	„ gelb	beginnende Lysis	starke Lysis	komplette Lysis	„
6	El Tor 4 hell	0	0	starke Lysis	„
	„ gelb	0	beginnende Lysis	komplette Lysis	„
7	NaCl	0	0	0	0

Die oben geschilderten Vorgänge der Hämolyse in Hammelblutkörperchenaufschwemmungen zeigen uns beispielshalber die Abbildungen 4, 5 und 6 der Tafel VI, von denen Figur 4 und 5 den negativen, bezw. positiven Ausfall der Reaktion bei der hellen, bezw. gelben Art eines schwach blutlösenden Cholerastammes (Cholera Heubeck) darstellt, während Abbildung 6 die Wirkungsweise einer stark hämolysierenden Cholerakultur (Chol. 74 vir.) innerhalb 24 Stunden wiedergibt.

Die Vibrionen der dritten bei mutierenden Cholerastämmen auf der Agarplatte auftretenden Kolonieform, der Ringform, welche, wie bereits erwähnt, in bezug auf Morphologie und färberisches Verhalten denen der hellen Kolonien sehr nahestehen, zeigen auch bezüglich des Hämolysierungsvermögens gegenüber der hellen Varietät keine Differenzen und vermögen bei den schwach hämolytischen Kulturen weder in den Blutkörperchenaufschwemmungen noch auf den festen Blutnährböden Blut aufzulösen. Zu diesen Untersuchungen, deren Ergebnis in der Tabelle 7 zusammengefaßt ist, wurden außer den Ringformen zur Kontrolle verschiedentlich die hell-, bezw. gelbwachsenden Vibrionenarten der betreffenden Cholerastämme herangezogen.

Tabelle 7.

5 % Hammelblutkörperchenaufschwemmung. 10 % Hammelblutagarplatte.

Nr.	Bezeichnung der Kultur	Ergebnis nach			Ergebnis nach	
		24 Stunden	48 Stunden	72 Stunden	24 Stunden	48 Stunden
1	Chol. H hell	0	0	0	0	0
	„ Ring	0	0	0	0	0
2	Chol. J hell	0	0	0	0	0
	„ Ring	0	0	0	0	0
3	Chol. D hell	0	0	0	0	0
	„ Ring	0	0	0	0	0
4	Chol. 819 hell	0	0	0	0	0
	„ Ring	0	0	0	0	0
5	Chol. 228 hell	0	0	0	0	0
	„ Ring	0	0	0	0	0
6	Chol. 230 hell	0	0	0	0	0
	„ Ring	0	0	0	0	0
	„ gelb	beginnende Lysis	fortschreitend	fortschreitend	0	fast komplette Aufhellung der Platte
7	Chol. 233 hell	0	0	0	0	0
	„ Ring	0	0	0	0	0
8	Chol. 232 hell	0	0	0	0	—
	„ Ring	0	0	0	0	—
	„ gelb	beginnende Lysis	fortschreitend	fortschreitend	0	an zahlreichen Stellen Aufhellung
9	NaCl	0	0	0	—	—

Peptonisierungsvermögen.

Von Interesse schien ferner auch eine Prüfung des Peptonisierungsvermögens der isolierten Mutationsstämme bei Cholera. Für diese Versuche wurden von den einzelnen Varietäten Gelatinestichkulturen angelegt und 8 Tage lang im Brutschrank bei 22° beobachtet.

Da bekanntlich bei älteren Cholerakulturen das Gelatinepeptonisierungsvermögen oft wenig ausgeprägt ist, so wurden zu den Untersuchungen neben älteren auch frisch isolierte Stämme unserer Sammlung herangezogen. Es ergab sich nun, wie aus der Zusammenstellung in Tabelle 8 ersichtlich ist, die auffallende Tatsache, daß ohne Rücksicht auf das Alter der Kulturen bei der Mehrzahl der geprüften Stämme die trüb wachsende Varietät ein starkes Peptonisierungsvermögen besaß, während die Vibrionen der hellen Kolonien die Gelatine kaum verflüssigten. Nur einzelne Kulturen wie z. B. Chol. Sarnow I und Chol. 230 zeigten denselben Grad der Gelatineverflüssigung bei den beiden Mutationsstämmen, während bei Chol. 228 sich bei keiner Varietät eine stärkere Beeinflussung des Nährbodens geltend machte.

Tabelle 8.

Nummer	Bezeichnung der Kultur	Ergebnis bei den Kolonien: hellen	Ergebnis bei den Kolonien: trüben	Nummer	Bezeichnung der Kultur	Ergebnis bei den Kolonien: hellen	Ergebnis bei den Kolonien: trüben
1	Chol. 94	—	starke Verflüssigung	8	Chol. 228	—	—
2	Chol. 231	—	desgl.	9	Chol. 232	—	geringe Verflüssigung
3	Chol. Freiburg	—	„	10	Chol. Heubeck	—	desgl.
4	Chol. Sarnow I	kräftige Verflüssigung	kräftige Verflüssigung	11	Chol. 234	—	„
5	Chol. Sarnow II	—	desgl.	12	Chol. 230	geringe Verflüssigung	„
6	Chol. 237	—	„	13	Chol. 233	—	— (Ringform)
7	Chol. Behrens	—	geringe Verflüssigung				

Cholerarotreaktion.

Zur Prüfung der Cholerastämme auf Indolbildung benutzte ich 5 Tage alte Peptonwasserkulturen der hellen, bezw. der gelben Varietät, die mit einigen Tropfen konzentr. Schwefelsäure versetzt wurden. Wir finden gemäß den in Tabelle 9 wiedergegebenen Untersuchungsergebnissen hinsichtlich der Cholerarotreaktion zwischen den verschiedenen Mutationsformen desselben Stammes keinen prinzipiellen Unterschied. Während bei der Mehrzahl der geprüften Stämme zwischen den beiden Vibrionenarten vollkommene Übereinstimmung besteht, zeigt die helle Varietät von Chol. Ch. und Chol. Baku deutliche, die gelbe dagegen nur geringe Indolbildung; bei Chol. Ruhleb. liegen die Verhältnisse gerade umgekehrt.

Tabelle 9.

Cholerarot-Reaktion (Indolbildung).

Nr.	Bezeichnung der Kultur	hellwachsende Vibrionen	gelbwachsende Vibrionen
1	Chol. Freiburg	rosa gefärbt	rosa gefärbt
2	Chol. 228	„	„
3	Chol. 231	„	„
4	Chol. 234	„	„
5	Chol. Ch.	„	orange gefärbt
6	Chol. Baku	schwach rosa gefärbt	„
7	Chol. Ruhleb.	orange gefärbt	rosa gefärbt
8	Chol. — 00	rosa gefärbt	„
9	Chol. G.	„	„
10	Chol. Ostpr.	„	„
11	Chol. 94	scharlachrot	rosa gefärbt

Serologisches Verhalten.

Was das serologische Verhalten der hellen und der gelben Art von Cholerastämmen betrifft, so wurde zunächst die Agglutinationsfähigkeit beider Vibrionengruppen mittels 4 verschiedener Sera untersucht, die sämtlich mit abgetöteten Kommabazillen von Chol. 74 vir. teils von Eseln, teils von Kaninchen gewonnen worden waren. Von Haendel und Woithe (7) und auch von mir (8) ist bereits darauf hingewiesen worden, daß die Agglutinationsprüfung durch dasselbe Serum bei den einzelnen Kulturen beträchtliche Unterschiede aufweisen kann. Auch Kraus (10) hat wiederholt auf diese Differenzen hingewiesen. Wir finden ganz entsprechende Verhältnisse bei den jetzt vorgenommenen Untersuchungen, die in Tabelle 10 übersichtlich zusammengestellt sind, wieder, indem z. B. die Mutationsstämme Chol. Ch. hell und gelb durch das Cholera-Kaninchenserum Nr. 11 noch in einer Verdünnung 1:5000, dagegen Chol. 94 und Chol. 74 vir. in ihren beiden Varietäten nur bei 1:2000 agglutiniert werden. Noch auffallender machen sich diese Differenzen bemerkbar bei der Agglutinationsprüfung mittels besonderer Sera, die durch Injektion von ab-

Tabelle 10. Agglutination mit verschiedenen Seris.

Nr.	Bezeichnung der Kultur	Cholera-Eselserum Nr. I	Cholera-Eselserum Nr. V	Cholera-Kaninchenserum Nr. 18	Cholera-Kaninchenserum Nr. 11
1	Chol. Ch hell	1:10 000	1:10 000	1:2 000	1:5 000
	„ gelb	1:10 000	1:8 000	1:2 000	1:5 000
2	Chol. H hell	1:10 000	1:8 000	1:2 000	1:3 000
	„ gelb	1:10 000	1:6 000	1:2 000	1:3 000
3	Chol. 94 hell	1: 8 000	1:8 000	1:2 000	1:2 000
	„ gelb	1: 8 000	1:8 000	1:2 000	1:2 000
4	Chol. 74 vir. hell	1:10 000	1:5 000	1:2 000	1:2 000
	„ gelb	1: 8 000	1:5 000	1:2 000	1:2 000

Tabelle 11. Agglutination mit besonderen Seris.

Nr.	Bezeichnung der Kultur	Cholera-Kaninchenserum, hergestellt mit Chol. H hell	Cholera-Kaninchenserum, hergestellt mit Chol. H gelb
1	Chol. H . . hell	1:3000	1:1000
	„ . . gelb	1:3000	1:1000
2	Chol. Ruhl. . hell	1: 300	1: 300
	„ . gelb	1: 200	1: 500
3	Chol. Ch . hell	1:1000	1: 500
	„ . . gelb	1: 500	1:1000
4	Chol. Freiburg hell	1:5000	1:5000
	„ gelb	1:1000	1:1000

getöteten Vibrionen des Spandauer Stammes Chol. Heubeck hell, bezw. Chol. Heubeck gelb von Kaninchen gewonnen waren. Wie aus Tabelle 11 zu ersehen ist, werden die beiden Vibrionenarten der Chol. Heubeck, die bei der Serumherstellung verwendet worden waren, durch das Serum Heub. hell bei einer Verdünnung von 1:3000 gut agglutiniert, die Bazillen der Chol. Freiburg hell sogar noch bei 1:5000, Chol. Ruhleb. aber wird im Vergleich zu diesen Kulturen erst bei 10fach, bezw. 20fach stärkerer Konzentration des Serums agglutinatorisch beeinflußt. Bei diesem zuletzt erwähnten Stamm, sowie bei Chol. Ch. ergibt sich für die beiden Varietäten eine gewisse, wenn auch geringgradige Spezifizität der Sera, indem die hellwachsenden, bezw. die gelbwachsenden Mutationsarten durch das homologe Serum noch in doppelt so starker Verdünnung wie durch das heterologe Serum deutlich agglutiniert werden. Immerhin ist aber im allgemeinen hinsichtlich der Agglutinabilität der Gegensatz zwischen den verschiedenen Varietäten eines Cholerastammes wesentlich geringer als zwischen den einzelnen Kulturen.

Ich suchte dann weiterhin festzustellen, in welchem Grade aus den mit der hell-, bezw. gelbwachsenden Vibrionenart der Chol. Heub. hergestellten Seris durch Abbindung mittels einer der beiden Varietäten von Chol. Heub. die Agglutinine herausgenommen werden, ferner ob bei dieser Abbindung eine gewisse, spezifische Beeinflussung stattfindet in der Weise, daß z. B. beim Serum Heub. hell eine Absorption von Agglutininen für die hellwachsenden Vibrionen in höherem Grade eintritt wie für die Bazillen der gelben Kolonieform. Auch hier führten die Untersuchungen, wie aus Tabelle 12 ersichtlich ist, zu Ergebnissen, die mit denen der oben beschriebenen Agglutinationsprüfungen im wesentlichen übereinstimmen. Es werden für die einzelnen Cholera-Kulturen die Agglutinine in ganz verschiedenem Maße durch die Abbindung aus den einzelnen Seris herausgenommen.

Bei einzelnen Cholerakulturen machte sich allerdings auch eine gewisse, spezifische Absorption von Agglutininen für die entsprechende Mutationsform geltend, so bleibt z. B. für Chol. Freiburg hell aus dem durch Chol. Heub. hell abgebundenen Serum Heub. hell nur der 100. Teil, für Chol. Freiburg gelb dagegen in demselben Serum noch der 10. Teil der früher vorhandenen Agglutinine übrig. Im allgemeinen

Tabelle 12. Agglutination mit abgebundenen Seris.

Nr.	Bezeichnung der Kultur	Choleraserum H. hell, abgebunden durch		Choleraserum H. gelb, abgebunden durch	
		Chol. H. hell	Chol. H. gelb	Chol. H. hell	Chol. H. gelb
1	Chol. 36 hell	1: 50 +	1:100 ±	1: 50 +	1: 50 +
	„ gelb	1: 50 +	1:100 ±	1: 50 +	1: 50 +
2	Chol. Ruhleb. hell	1: 50 ±	1: 50 ±	1: 50 ±	1: 50 ±
	„ „ gelb	1: 50 ±	1: 50 ±	1: 50 ±	1: 50 ±
3	Chol. Ch. hell	1:100 +	1:100 ±	1:100 +	1:200 ±
	„ „ gelb	1:200 +	1: 50 +	1:200 +	1: 50 +
4	Chol. Freiburg hell	1: 50 ±	1:100 ±	1:100 ±	1: 50 ±
	„ „ gelb	1:100 ±	1: 50 ±	1:100 ±	1: 50 —

ist jedoch im Vergleich zu den beträchtlichen Unterschieden bei den einzelnen Kulturen die Verschiedenheit der Absorption der Agglutinine bei den einzelnen Varietäten eines Stammes so gering, daß sie praktisch nicht in Betracht kommt. Was die Technik der Serumabbindung betrifft, so wurde in der Weise vorgegangen, daß von jeder Varietät 1 Kultur mit $^1/_2$ ccm Kochsalzlösung abgeschwemmt und mit je $4^1/_2$ cm der im Verhältnis von 1:50 verdünnten Sera Heub. hell, bezw. Heub. gelb gemischt wurde. Die Reagenzröhrchen wurden dann ebenso wie die als Kontrolle dienenden, nur je 5 ccm der im Verhältnis 1:50 verdünnten Sera Heub. hell, bezw. Heub. gelb enthaltenden Gläschen 2 Stunden im Brutschrank bei 37° aufbewahrt. Nach Abzentrifugieren der Kulturen wurden sämtliche Sera, sowohl die als Kontrolle dienenden, nicht abgebundenen wie die abgesättigten, auf den Gehalt an Agglutininen ausgewertet.

Im Anschluß an die agglutinatorischen Untersuchungen prüfte ich dann noch die Frage, ob überhaupt und in welchem Maße bei den oben erwähnten besonderen Choleraseris Heubeck hell und Heub. gelb, sei es in unverändertem Zustand, sei es in abgebundener Form, durch hell-, bezw. gelbwachsende Vibrionen eine für die homologe Varietät spezifische Komplementbindung eintreten könne. Zu diesen Versuchen wurden fallende Mengen des $^1/_2$ Stunde bei 60° im Brutschrank inaktivierten Choleraserums Heub. hell, bezw. Heub. gelb und je $^1/_5$ Öse der 1 Stunde bei 60° abgetöteten Kultur Chol. Heub. hell, bezw. Chol. Heub. gelb, ferner der beiden Varietäten von Chol. 94 benutzt. Die Ergebnisse der Versuche mit den gewöhnlichen und mit den abgebundenen Seris sind in den Tabellen 13 und 14 a und b zusammengestellt. Wie aus der Tabelle 13 hervorgeht, läßt sich bei Verwendung der einfachen Sera sowohl bei Chol. Heub. wie bei Chol. 94 eine, wenn auch geringgradige, so doch für die betreffende Kolonienart spezifische Komplementbindung gleichmäßig nachweisen, die um eine Verdünnungsstufe gegenüber der anderen Kolonieform differiert. Dagegen sehen wir bei Benutzung der abgebundenen Sera laut Tabelle 14a und 14b kein entsprechend gleichmäßiges Verhalten. Nur in einem Falle, nämlich bei der gelben Varietät von Chol. 94 tritt durch das Serum

Tabelle 13.

Komplementbindung mit besonderen Seris.

Verwendete Serummenge	Choleraserum H hell + Chol. H hell	Choleraserum H hell + Chol. H gelb	Choleraserum H gelb + Chol. H hell	Choleraserum H gelb + Chol. H gelb
0,03 ccm	kompl. Hemmung	kompl. Hemmung	kompl. Hemmung	kompl. Hemmung
0,01 „	„	„	starke Hemmung	starke Hemmung
0,003 „	starke Hemmung	starke Hemmung	Spur Hemmung	noch deutliche Hemmung
0,001 „	geringe Hemmung	noch deutliche Hemmung	Hämolyse	Hämolyse
0,0003 „	noch deutliche Hemmung	Hämolyse	„	„

Verwendete Serummenge	Choleraserum H hell + Chol. 94 hell	Choleraserum H hell + Chol. 94 gelb	Choleraserum H gelb + Chol. 94 hell	Choleraserum H gelb + Chol. 94 gelb
0,03 ccm	kompl. Hemmung	kompl. Hemmung	fast komplette Hemmung	kompl. Hemmung
0,01 „	„	starke Hemmung	Spur	deutliche Hemmung
0,003 „	sehr starke Hemmung	geringe Hemmung	Hämolyse	Spur
0,001 „	starke Hemmung	Spur	„	Hämolyse
0,0003 „	geringe Hemmung	Hämolyse	„	„

Tabelle 14a.

Komplementbindung mit besonderen, abgebundenen Seris.

Verwendete Serummenge	Choleraserum H hell, abgebunden durch Chol. H hell + Chol. H hell	Choleraserum H hell, abgebunden durch Chol. H hell + Chol. H gelb	Choleraserum H gelb, abgebunden durch Chol. H gelb + Chol. H hell	Choleraserum H gelb, abgebunden durch Chol. H gelb + Chol. H gelb
0,04 ccm	starke Hemmung	starke Hemmung	Spur Hemmung	Spur Hemmung
0,02 „	Spur Hemmung	Spur Hemmung	Spürchen von Hemmung	Spürchen von Hemmung
0,01 „	Hämolyse	Hämolyse	Hämolyse	Hämolyse
0,003 „	„	„	„	„

Verwendete Serummenge	Choleraserum H hell, abgebunden durch Chol. H gelb + Chol. H hell	Choleraserum H hell, abgebunden durch Chol. H gelb + Chol. H gelb	Choleraserum H gelb, abgebunden durch Chol. H hell + Chol. H hell	Choleraserum H gelb, abgebunden durch Chol. H hell + Chol. H gelb
0,04 ccm	kompl. Hemmung	kompl. Hemmung	fast komplette Hemmung	fast komplette Hemmung
0,02 „	starke Hemmung	„	deutliche Hemmung	deutliche Hemmung
0,01 „	deutliche Hemmung	starke Hemmung	Spur Hemmung	Spur Hemmung
0,003 „	Hämolyse	dentliche Hemmung	Hämolyse	Hämolyse

Tabelle 14b. Komplementbindung mit besonderen, abgebundenen Seris.

Verwendete Serummenge	Choleraserum H hell, abgebunden durch Chol. H hell +		Choleraserum H gelb, abgebunden durch Chol. H gelb +	
	Chol. 94 hell	Chol. 94 gelb	Chol. 94 hell	Chol. 94 gelb
0,04 ccm	kompl. Hemmung	kompl. Hemmung	kompl. Hemmung	kompl. Hemmung
0,02 „	starke Hemmung	fast komplette Hemmung	starke Hemmung	deutliche Hemmung
0,01 „	deutliche Hemmung	starke Hemmung	deutliche Hemmung	Hämolyse
0,003 „	Spur Hemmung	deutliche Hemmung	Hämolyse	„

Verwendete Serummenge	Choleraserum H hell, abgebunden durch Chol. H gelb +		Choleraserum H gelb, abgebunden durch Chol. H hell +	
	Chol. 94 hell	Chol. 94 gelb	Chol. 94 hell	Chol. 94 gelb
0,04 ccm	fast komplette Hemmung	kompl. Hemmung	deutliche Hemmung	deutliche Hemmung
0,02 „	starke Hemmung	starke Hemmung	Spur Hemmung	Spur Hemmung
0,01 „	Spur Hemmung	Spur Hemmung	Hämolyse	Hämolyse
0,003 „	Hämolyse	Hämolyse	„	„

Heub. gelb, nach der Abbindung durch Chol. Heub. gelb, im Vergleich mit dem hellen Mutationsstamm von Chol. 94 eine geringere spezifische Beeinflussung ein, die aber gegenüber den übrigen Ergebnissen nicht weiter in Betracht kommen dürfte.

Virulenz- und Toxinprüfung.

Wiederholte Prüfungen der Virulenz und im Pfeifferschen Versuch ließen keine nennenswerten Unterschiede zwischen den einzelnen Mutationsarten von Cholerakulturen erkennen. Zum Nachweis, ob sich ähnlich wie bei den Hämolysinversuchen auch bezüglich der Bildung von Toxinen Differenzen zwischen hellen und gelben Stämmen feststellen lassen würden, wählte ich einmal die hell- und gelbwachsende Vibrionenart der Spandauer Chol. Heubeck, und dann die gleichen Varietäten eines als hochvirulent bekannten Laboratoriumsstammes, der Chol. 74 vir. Wie bei früheren Untersuchungen wurden nach der Methode von Kraus und Russ (11) jeweils 5tägige Bouillonkulturen von Chol. Heub. hell und gelb mit 0,5%iger Karbolsäure versetzt und mittels Papierfilters bis zur möglichsten Klarheit filtriert. Dann wurden Kaninchen von etwa 700—750 g Körpergewicht je 2 ccm der Bouillonfiltrate intravenös einverleibt. Es traten keine besonderen akuten Krankheitserscheinungen auf, dagegen starb das mit Chol. 74 vir. hell behandelte Tier nach 12 Stunden, das mit Chol. 74 vir. gelb gespritzte nach 2 Tagen. Bei einem später vorgenommenem Versuche mit Chol. 74 vir. hell, bezw. gelb zeigten beide Tiere keine auffallenden Krankheitssymptome und blieben am Leben. Das genaue Ergebnis der Versuche ist in Tabelle 15 zusammenfassend dargestellt. Der Nachweis von akut wirkenden Toxinen ist also bei diesem Versuch nicht gelungen.

Tabelle 15.

Nr.	Bezeichnung der Kultur	Infektionsdosis der 5tägigen Bouillonfiltrate	Ergebnis
	1. Versuch		
1	Chol. Heubeck hell	2 ccm Filtrat	Kaninchen lebt
2	Chol. Heubeck gelb	„	„
3	Chol. 74 vir. hell	„	Kaninchen † nach 12 Stunden
4	Chol. 74 vir. gelb	„	Kaninchen † nach 2 Tagen
	2. Versuch		
1	Chol. 74 vir. hell	2 ccm Filtrat	Kaninchen lebt
2	Chol. 74 vir. gelb	„	„

II. Vibrionen.

Die bei Cholera erhaltenen Befunde veranlaßten mich auch bei anderen Vibrionen Untersuchungen auf etwaige Mutationserscheinungen vorzunehmen. Ich benutzte zu dieser Prüfung neben Vibrio Metschnikoff noch eine Anzahl von choleraähnlichen Vibrionenstämmen, welche teils aus Wasser teils aus menschlichem Stuhl isoliert worden waren. Es gelang mir ohne besondere Mühe, auch bei diesen Stämmen Mutationsvorgänge zu beobachten, und ich erhielt bei denselben Mutationsbilder, welche an die bei Cholerakulturen auftretenden stark erinnern. Bei Vibrio Elwers und Vibrio 6 z. B. finden sich sogar die 3 Kolonieformen deutlich ausgeprägt, wie sie oben für die mutierenden Cholerastämme beschrieben worden waren; einmal helle, bläulich schimmernde, durchscheinende Kolonien, ferner die Ringformen und endlich trübe, undurchsichtige, gelbweiße Kolonien. Auch hier bestehen zwischen den Bazillen, aus denen sich die verschiedenen Kolonienarten zusammensetzen, ausgeprägte, morphologische Differenzen. Die hellen, durchscheinenden Kolonien werden wie bei Cholera von schlanken, gut gekrümmten und gleichmäßig gefärbten Stäbchen gebildet, die trüben, undurchsichtigen Kolonien entweder aus kurzen, dicken, plumpen, bipolar gefärbten, ebenfalls gut gekrümmten Bazillen oder bei Vibrionenstämmen, die sich aus länger wachsenden Kommabazillen zusammensetzen, aus langen, dicken, segmentiert gefärbten Stäbchen (vergl. hierzu die Abbildungen der Tafel V und die Fig. 1 u. 2 der Tafel IX). Die in Ringform wachsenden Kolonien werden wie bei Cholera von Vibrionen gebildet, die hinsichtlich ihrer Morphologie und ihres färberischen Verhaltens den Bazillen der hellen Kolonien sehr nahe stehen und ebenfalls schlanke, gut gekrümmte, gleichmäßig gefärbte Stäbchen darstellen. Bei der Überimpfung auf andere feste Nährböden bleiben die morphologischen Differenzen der Vibrionen der verschiedenen Mutationsstämme gut erhalten. Dagegen lassen sich Unterschiede zwischen den Kolonien selbst auf den anderen festen Nährmedien z. B. auf dem Dieudonnéschen Blutalkaliagar nicht deutlich feststellen. Eine Ausnahme macht dabei der Lackmus-Laktose-Agar, auf dem bei den isolierten Kolonienarten der meisten Vibrionenkulturen eine deutlichere Unterscheidung der Mutationsformen wie bei Cholera

möglich ist. Auf diesem Nährboden wachsen z. B. bei den Kulturen Petersburg und 147 die hellen, durchscheinenden Kolonien der Agarplatte in Form von hellblauen, zarten, durchscheinenden Scheiben, die trüben, undurchsichtigen dagegen als kleine, saftige, durch einen violetten Farbenton ausgezeichnete Kolonien.

Was nun das Wachstum der Mutationsstämme auf der Gelatineplatte, insbesondere die peptonisierenden Fähigkeiten der Vibrionen, und weiterhin ihre hämolytischen Eigenschaften betrifft, so finden wir bei der Mehrzahl der geprüften Kulturen ähnlich wie bei Cholera sowohl bei der hellen wie bei der trüben Varietät auf der Gelatineplatte helle, lichtbrechende, als charakteristisch geltende Kolonien. Dagegen bestehen, wie aus Tabelle 16 hervorgeht, zwischen den einzelnen Mutationsstämmen einer Kultur hinsichtlich des Peptonisierungsvermögens keine prinzipiellen Unterschiede. So sehen wir in Gelatinestichkulturen nach 8tägiger Aufbewahrung im Brutschrank von 22° bei der Mehrzahl der untersuchten Vibrionenstämme durch die Bakterien beider Kolonieformen eine gleichmäßig starke Verflüssigung des Nährbodens eintreten. Bei einzelnen Kulturen z. B. Vibrio 896 E und 957 E ist das Peptonisierungsvermögen bei den Bakterien der hellen Varietät geringer als bei denen der trüb wachsenden Kolonienart; umgekehrt liegen die Verhältnisse bei den Stämmen Vibr. 2261 B und Vibr. Krüger.

Tabelle 16.

Nummer	Bezeichnung der Kultur	Ergebnis bei den Kolonien: hellen	trüben
1	Vibrio Metschnikoff	mäßig starke Verflüssigung	wie hell
2	Vibrio Petersburg Nr. 0	sehr starke Verflüssigung	ziemlich starke Verflüssigung, geringer wie bei hell
3	Vibrio 2261 B	„	„
4	Vibrio 6	mäßig starke Verflüssigung	wie hell
5	Vibrio 10	sehr starke Verflüssigung	„
6	Vibrio 147	„	„
7	Vibrio Kind	„	„
8	Vibrio Krüger	ziemlich starke Verflüssigung	mäßige Verflüssigung
9	Vibrio Elwers	mäßig starke Verflüssigung	wie hell
10	Vibrio 231	„	„
11	Vibrio 896 Ha	geringe Verflüssigung	starke Verflüssigung
12	Vibrio 957 Ha	„	„
13	Vibrio 746 Ha	starke Verflüssigung	wie hell
14	Vibrio Finkler-Prior	„	„

Die Untersuchungen über das hämolytische Verhalten der Vibrionenstämme war von besonderem Interesse wegen der Feststellung, ob sich auch hier bei den isolierten Mutationsstämmen der hämolytisch wirkenden Vibrionenkulturen ähnlich wie bei den stark blutlösenden Cholerastämmen ein durchgreifender Unterschied in der Weise geltend machen würde, daß bei den in trüben Kolonien wachsenden Mutationsformen die Hämolyse durchweg früher auftritt und rascher verläuft als bei den entsprechen-

den, hellwachsenden Mutationsstämmen der gleichen Vibrionenkulturen, sowie ob auch bei den nichthämolysierenden, choleraähnlichen Vibrionen nur die gelbwachsende, nicht aber die helle Kolonien bildende Varietät Blut aufzulösen vermag. In der Tat zeigen, wie aus Tabelle 17 ersichtlich ist, die Mutationsstämme der hämolytischen Vibrionenkulturen in dieser Hinsicht ein ganz entsprechendes Verhalten wie die hämolytischen, echten Cholerastämme. Um so auffallender ist es daher, daß von den 2 nicht blutlösenden, choleraähnlichen Vibrionenkulturen, die mir zur Verfügung standen, dem aus Wasser isolierten Vibrio Petersburg Nr. 0 und dem aus mensch-

Tabelle 17.

Nr.	Bezeichnung der Kultur	Ergebnis nach			
		3 Stunden	8 Stunden	24 Stunden	32 Stunden
1	Vibrio 6 hell	—	starke Lysis	komplette Lysis	—
	Vibrio 6 trüb	—	komplette Lysis	—	—
2	Vibrio 10 hell	beginnende Lysis	komplette Lysis	—	—
	Vibrio 10 trüb	komplette Lysis	—	—	—
3	Vibrio 147 hell	—	schwach beginnende Lysis	lebhafte Lysis	komplette Lysis
	Vibrio 147 trüb	beginnende Lysis	fast komplette Lysis	komplette Lysis	—
4	Vibrio 231 hell	—	beginnende Lysis	fast komplette Lysis	komplette Lysis
	Vibrio 231 trüb	komplette Lysis	—	—	—
5	Vibrio Elwers hell	—	—	lebhaft beginnende Lysis	fast komplette Lysis
	Vibrio Elwers trüb	—	fast komplette Lysis	komplette Lysis	—
6	Vibrio 896 Ha hell	beginnende Lysis	komplette Lysis	—	—
	Vibrio 896 Ha trüb	komplette Lysis	—	—	—
7	Vibrio Metschnikoff hell	beginnende Lysis	komplette Lysis	—	—
	Vibrio Metschnikoff trüb	fast komplette Lysis	„	—	—
8	Vibrio 957 Ha hell	—	starke Lysis	komplette Lysis	—
	Vibrio 957 Ha trüb	beginnende Lysis	komplette Lysis	—	—
9	Vibrio 2261 Be hell	—	—	lebhaft fortschreitende Lysis	fast komplette Lysis
	Vibrio 2261 Be trüb	—	—	komplette Lysis	—
10	Vibrio 788 Ha hell	—	starke Lysis	komplette Lysis	—
	Vibrio 788 Ha trüb	beginnende Lysis	komplette Lysis	—	—
11	Vibrio Petersburg hell	—	—	—	—
	Vibrio Petersburg trüb	—	—	—	—
12	Vibrio Krüger hell	—	—	—	—
	Vibrio Krüger trüb	—	—	—	—

lichem Stuhl gezüchteten Vibrio Krüger, beide Mutationsstämme, also auch die trübe Kolonien bildende Varietät, im Gegensatz zu allen bisher von mir geprüften, gelbwachsenden Cholera-Mutationsstämmen keinerlei hämolytische Wirkung erkennen ließen. Die Versuchstechnik war dieselbe, wie sie oben für die entsprechenden Untersuchungen bei Cholera beschrieben worden war. Es wurden in diesem Falle keine Blutplatten, sondern nur Hammelblutkörperchenaufschwemmungen benutzt.

Das agglutinatorische Verhalten der hellen und trüben Kolonienart von choleraähnlichen Vibrionenstämmen wurde bei verschiedenen Kulturen z. B. Vibrio 6, Vibrio Elwers, Vibrio Krüger mittels der entsprechenden Sera geprüft. Dabei ergab sich zwischen den differenten Mutationsstämmen der einzelnen Kulturen hinsichtlich der Agglutinabilität kein nennenswerter Unterschied; die Bakterien der 2, bezw. 3 verschiedenen Kolonienarten wurden von dem betreffenden Serum stets bis zur Titergrenze agglutiniert.

In einer früheren Arbeit „Über die Differentialdiagnose der choleraähnlichen Vibrionen“ (1) hatte ich bereits erwähnt, daß die verschiedenen choleraähnlichen Vibrionenstämme, wie auch echte Cholerakulturen auf den für die Typhusdiagnose gebräuchlichen Differentialnährböden übereinstimmend ein ganz charakteristisches Wachstum zeigten. Meines Wissens liegen umfassende, derartige Untersuchungen sonst noch nicht vor. Ich hatte damals beobachten können, daß von den Vibrionen in der Milch eine stark saure Reaktion, meist verbunden mit kräftiger Koagulation, in den Nährlösungen Barsiekow I und Hetsch infolge der Säurebildung eine beträchtliche Rötung unter mehr oder weniger starker Trübung, an deren Stelle häufig direkte Ausfällung tritt, herbeigeführt wurde. Barsiekow II wurde von einem Teil der Vibrionenkulturen mehr oder weniger stark, häufig sogar komplett aufgehellt, von einem anderen Teil mehr oder weniger intensiv gerötet, wobei es dann später in vielen Fällen schließlich zu einer vollständigen Entfärbung des Nährbodens kommen kann. Bei der Lackmusmolke erfolgte durch die Kommabazillen verschiedentlich eine geringe Blau- bis Violettfärbung, indessen tritt später gewöhnlich ein Umschlag in Rotfärbung, bezw. eine totale Aufhellung ein. In den Gärungsröhrchen von Traubenzucker-, bezw. Milchzuckerbouillon zeigten die Stämme in beiden Schenkeln gleichmäßige Trübung und keine Gasbildung. Die Stichkultur ließ den Neutralrotagar vollkommen unbeeinflußt. Ebenso blieben die beiden Löfflerschen Malachitgrünlösungen bei den Vibrionen häufig ganz unverändert, oder Löffler I wurde stark getrübt, bezw. koaguliert, während Löffler II unter gleichzeitiger Trübung und starker Häutchenbildung komplett aufgehellt wurde.

Es lag nun der Gedanke nahe, daß der verschiedenartige Ausfall der Reaktion bei einzelnen Nährmedien z. B. bei Barsiekow II-Lösung, Löffler I und II, ferner der Umschlag der Reaktion, bezw. die Aufhellung bei Lackmusmolke vielleicht mit Mutationsvorgängen bei den überimpften Kulturen in Zusammenhang stehen könnte. Ich stellte daher diesbezügliche Untersuchungen bei den isolierten Mutationsstämmen einer Anzahl Vibrionenkulturen verschiedener Herkunft an. Wie aus dem in Tabelle 18 (S. 458 u. 459) zusammengefaßten Ergebnis hervorgeht, zeigen sich auf den einzelnen Nährböden, soweit diese überhaupt verändert werden, nur Schwankungen im Reaktions-

ausschlag zwischen den einzelnen Varietäten einer Kultur. Die Unterschiede im kulturellen Verhalten der isolierten Mutationsformen eines Stammes erreichen auf den Differentialnährböden dabei in der Regel nicht einmal einen Intensitätsgrad, wie er im Wachstum der einzelnen Kulturen untereinander gelegentlich zutage tritt.

III. Typhus.

Nachdem es sich so gezeigt hatte, daß fast bei allen untersuchten Choleraстämmen und choleraähnlichen Vibrionen, abgesehen von ganz vereinzelten Ausnahmen die beschriebenen, mutationsartigen Vorgänge unter bestimmten Bedingungen einsetzen, lag es nahe, diese Verhältnisse auch bei anderen Bakterienarten zu untersuchen. Ich prüfte weiterhin zunächst eine größere Anzahl teils frisch isolierter, teils älterer Laboratoriumsstämme von Typhus nach dieser Richtung durch. Es zeigte sich bald, daß auch hier ähnliche Erscheinungen wie bei den Choleravibrionen auftreten können; andererseits machten sich aber sofort gewisse Differenzen gegenüber den bei Cholera gefundenen Verhältnissen geltend.

Als ich bei älteren Laboratoriumsstämmen, von denen beispielsweise die Kulturen Typhus 234, Typhus Kersten, Typhus Krause erwähnt seien, aus mehrere Monate alten Agarröhrchen unserer Sammlung Ausstriche auf den gewöhnlichen Agarplatten machte, wuchsen zwar, ähnlich wie bei Cholera, auf diesem Nährboden ebenfalls helle, durchscheinende Kolonien und daneben gelbweiße, saftigere, undurchsichtige. Ebenso zeigten sich auch hier wieder zwischen den Bakterien, welche die verschiedenen Kolonien bilden, weitgehende morphologische Differenzen. Den hellen Kolonieformen entsprechen lange, schlanke Stäbchen, die gelbweißen Kolonien bestehen aus kurzen, dicken plumpen Bazillen. Im Gegensatze zu den mutierenden Choleravibrionen finden wir aber keine Segmentierung oder Polfärbung, sondern eine durchweg gleichmäßige Imbibierung der differenten Bakterien mit dem Farbstoff.

Ganz andere Mutationsbilder weist nun aber eine 2. Gruppe von Typhusstämmen auf, zu denen Typhus Stettin und Typhus T unserer Sammlung gehören. Hier entwickeln sich wie in Figur 1 der Tafel VII dargestellt ist auf der Agarplatte neben hellen, deutlich bröckeligen, durchscheinenden Kolonien noch homogene, glattrandige, trübere Formen. Zwischen den Bakterien, aus denen sich jeweils diese differenten Kolonien zusammensetzen bestehen ebenfalls wieder weitgehende morphologische Gegensätze, die in den Figuren 3 und 4 der Tafel IX festgehalten sind, die hellen, bröckeligen Kolonien werden von dünnen, schlanken, meist in Form langer Fäden wachsenden Stäbchen gebildet, die glattrandigen trüberen Formen setzen sich aus kurzen, dicken, plumpen Bazillen zusammen.

Eine 3. Gruppe von mutierenden Typhusstämmen endlich, die z. B. durch unsere Laboratoriumsstämme Typhus Gläwe und Typhus Breinsch vertreten ist, zeigt wiederum andere, markante Mutationserscheinungen auf der Agarplatte. Bei Ausstrichen aus mehrere Monate alten Agarröhrchen wuchsen einmal weinblattartige, scharfzackige, größere, flache Scheiben und außerdem noch kleinere, helle, glattrandige Kolonien. Den großen, weinblattförmigen Kolonien entsprechen längere, schlanke Stäbchen, die kleinen, hellen, glattrandigen Formen bestehen aus kurzen, dicken Bazillen.

Tabelle

Nummer	Bezeichnung der Kultur	Löffler I	Löffler II	Lackmusmolke	Barsiekow I
1	Vibrio 6 hell	—	—	starke Rötung und feine Trübung	Rötung und starke Trübung
	Vibrio 6 gelb	—	—	„	Rötung und geringe Trübung
	Vibrio 6 Ringform	—	—	„	„
2	Vibrio 10 hell	starke Trübung	—	bis zum 3. Tag tiefe Blauviolettfärbung, dann Umschlag in Rotviolettfärbung und beginnende Entfärbung	Rötung, geringe Trübung
	Vibrio 10 trüb	—	komplette Aufhellung, Häutchenbildung	„	„
3	Vibrio 147 hell	—	—	bis zum 4. Tag tiefe Blauviolettfärbung, dann Umschlag in Rotviolettfärbung und schließlich Entfärbung	Rötung und starke Trübung
	Vibrio 147 gelb	—	komplette Aufhellung, Häutchenbildung	„	„
4	Vibrio Metschnikoff hell	—	—	geringe Rötung und Trübung	starke Rötung und Trübung
	Vibrio Metschnikoff gelb	—	—	Blauviolettfärbung, Trübung, Häutchenbildung	„
5	Petersburg 0 hell	—	komplette Aufhellung mitHäutchenbildung	starke Rötung, feine Trübung	starke Rötung, feine Trübung
	Petersburg 0 gelb	—	„	„	„
6	Vibrio Krüger hell	—	—	Rötung	Rötung, geringe Trübung
	Vibrio Krüger trüb	—	—	„	„
7	Vibrio 2261 B hell	—	—	starke Rötung, geringe Trübung	starke Rötung und Trübung
	Vibrio 2261 B gelb	—	—	Rotviolettfärbung, geringe Trübung	„
8	Vibrio Finkler Prior hell	—	—	starke Rötung, geringe Trübung	starke Rötung und Trübung
	Vibrio Finkler Prior trüb	—	—	„	„

18.

Barsiekow II	Milch	Hetsch	Traubenzucker-Bouillon	Milchzucker-Bouillon	Neutralrotagar
starke Rötung	unverändert, Reaktion stark sauer	starke Rötung und Trübung	—	—	—
geringe Rötung	„	starke Rötung	—	—	—
starke Rötung	„	starke Rötung und Trübung	—	—	—
Tiefblaufärbung, Trübung, Häutchenbildung	starke Koagulation, Reaktion neutral	starke Rötung und Trübung	—	—	—
—	„	„	—	—	—
geringe Rötung	starke Koagulation, Reaktion neutral	starke Rötung und Koagulation	—	—	—
„	„	starke Rötung und Trübung	—	—	—
beginnende Entfärbung, so daß noch mattblaue Farbe besteht, Trübung, Häutchenbildung	Koagulation, Reaktion stark sauer	Rötung und Trübung	—	—	—
Blaufärbung noch etwas stärker, sonst wie 8	unverändert, Reaktion stark sauer	„	—	—	—
geringe Rötung und Trübung	unverändert, Reaktion stark sauer	Rötnng u. Trübung	—	—	—
geringe Rötung, Trübung, Häutchenbildung	„	„	—	—	—
starke Rötung	unverändert, Reaktion stark sauer	Rötung, geringe Trübung	—	—	—
geringe Rötung	„	„	—	—	—
komplette Aufhellung, Trübung, Häutchenbildung	unverändert, stark saure Reaktion	starke Rötung und Trübung	—	—	—
„	Koagulation, Reaktion stark sauer	starke Rötung und Koagulation	—	—	—
komplette Aufhellung, Trübung, Häutchenbildung	Koagulation, Reaktion stark sauer	Rötung und Trübung	—	—	—
—	„	„	—	—	—

Abgesehen davon, daß sich bei den Mutationsvorgängen die Typhuskulturen von den Cholerastämmen durch die geschilderte Gruppenbildung hinsichtlich der verschiedenartigen Kolonieformen unterscheiden, weichen sie auch insofern in ihrem Verhalten von den Vibrionenkulturen ab, als bei Typhus die Mutationserscheinungen im allgemeinen erst ziemlich spät auftreten, in der Regel, wenn die beimpften Agarröhrchen mindestens 2—3 Monate alt sind. Entsprechend kommt es bei den einzelnen isolierten Mutationsformen derselben Kultur auch erst später wie bei Cholera wieder zu atavistischen Rückschlägen. Es ist mir z. B. bei Typhus Breinsch gelungen, noch nach 2 Monaten aus den die isolierten Varietäten enthaltenden Agarröhrchen bei der Weiterimpfung nur die entsprechenden Kolonien auf der Agarplatte zur Entwicklung zu bringen, während bei den isolierten Arten eines Cholerastammes, wie erwähnt, gewöhnlich nach 3 Wochen langem Stehen der Agarröhrchen schon erneut Mutationserscheinungen zu beobachten sind.

Auffallend erscheint weiterhin die Tatsache, daß die einzelnen Typhusstämme nach den Beobachtungen nicht ständig an ein und dasselbe Mutationsbild gebunden sind. So fiel mir z. B. bei Typhus 234 und Typhus 194, die beide beim Einsetzen der Mutation einerseits helle, durchscheinende, andererseits gelbweiße, undurchsichtige Kolonien gebildet hatten, auf, daß plötzlich bei den 2 Monate lang aufbewahrten, isolierten Varietäten des Typhus 234 übereinstimmend das Mutationsbild der 3. Gruppe von Typhuskulturen (Typhus Gläwe) sich zeigte, also neben weinblattförmigen, scharfzackigen, größeren, noch glattrandige, helle, kleinere Kolonien nach der Aussaat auf den Agarplatten sich entwickelten, bei Typhus 194 dagegen die Mutationsformen der 2. Gruppe, nämlich helle, durchscheinende, bröckelige Kolonien und daneben homogene, glattrandige, etwas trübere bei einer späteren Prüfung wuchsen. Ob die Ursache für dieses eigenartige Verhalten in der Beschaffenheit des jeweils benutzten Agars, wie man vielleicht vermuten könnte, zu suchen ist, hat sich nicht feststellen lassen. Nach dieser Richtung hin vorgenommene Untersuchungen haben bisher keinen Anhaltspunkt für eine solche Annahme geboten.

Bei Überimpfung auf gewisse andere feste Nährböden wie z. B. Gelatine, Malachitgrünagar ergaben sich ähnlich wie bei Cholera keine so deutlich ausgesprochene Unterschiede bezüglich der Mutationsform zwischen den isolierten Varietäten, die indessen bei Rückimpfung auf Agar sofort wieder die früheren, charakteristischen, differenten Kolonieformen aufwiesen. Die bekannten morphologischen Unterschiede der Bazillen blieben aber, wie ich bereits früher hervorgehoben habe, auch auf den anderen Nährböden bei den getrennten Stämmen deutlich ausgeprägt erhalten. Eine besondere Stellung unter den festen Nährböden nehmen jedoch die Drigalskischen Blauplatten bezüglich der Mutationserscheinungen bei Typhus ein. Während die mutierten Arten von Cholerastämmen auf den Lackmus-Laktose-Agarplatten im allgemeinen keine deutliche Differenzierung der betreffenden Kolonien gestatten, bleibt bei den verschiedenen Mutationsgruppen der Typhusstämme auf dem genannten Nährboden bei den isolierten Varietäten die Eigenart ihrer Kolonieform ebenfalls gut erkennbar. Während z. B. bei Typhus Kersten der 1. Mutationsgruppe die hellen, durchscheinenden Kolonien der Agarplatte auf der Blauplatte in Form von feinen, zarten, dunkelblauen

Scheibchen sich entwickeln, entsprechen den gelbweißen, undurchsichtigen Agarkolonien des gleichen Stammes auf dem Drigalskischen Nährboden saftige, hellblaue, nicht durchscheinende Kolonien. Bei der 2. Gruppe finden wir die hellen, bröckeligen, durchscheinenden Kolonieformen der Agarplatte auf dem bunten Nährmedium als feine, bröckelige, zarte Scheiben wieder, die glattrandigen, trüberen Kolonien ebenfalls als glattrandige, homogene, etwas weniger durchscheinende Scheiben. Auch bei der 3. Mutationsgruppe von Typhuskulturen (Typhus Gläwe) bewahren die von der Agarplatte übergeimpften, isolierten Arten eines Stammes ihr charakteristisches Aussehen, indem die weinblattförmigen, scharfzackigen, größeren und (etwas) trüberen Kolonien der Agarplatte auf dem Lackmus-Laktose-Agar in Form von großen, weinblattförmigen, trübhellblauen Scheiben wachsen, und die kleinen, glattrandigen, helleren auf dem neuen Nährboden zarte, feine, schwach durchscheinende dunkelblaue Formen bilden. Erwähnen möchte ich allerdings, daß auf dem Drigalskischen Nährboden die Unterschiede zwischen den einzelnen Kolonienarten wegen der durch die blaue Färbung verminderten Durchsichtigkeit des Nährmediums nicht ganz so markant zutage treten als auf der Agarplatte. Die weitgehenden, morphologischen Differenzen der verschiedenen Bakterien, aus denen jeweils die einzelnen Kolonienarten sich zusammensetzen, erleiden bei der Überimpfung auf die Blauplatte ebenfalls keinerlei Veränderungen.

Speziell bei der Typhusgruppe erschien es nun von Interesse, die verschiedenen Varietäten der Typhuskulturen auf den Differentialnährböden nachzuprüfen, ob sich vielleicht gewisse Unterschiede im Verhalten auf diesen Nährmedien nachweisen ließen. Zu diesen Untersuchungen wählte ich die Löfflerschen Lösungen I und II, also Malachitgrün-Pepton-Nutroselösung + Traubenzucker + Milchzucker, und Malachitgrün-Pepton-Nutroselösung + Milchzucker, ferner Lackmusmolke, Milch, Barsiekow I und II (Lackmus-Nutrose-Traubenzuckerlösung, bezw. Lackmus-Nutrose-Milchzuckerlösung), die von Hetsch angegebene Lackmus-Nutrose-Mannitlösung, Traubenzuckerbouillon, Milchzuckerbouillon, Neutralrotagar und Orceïnagar. Zum Ergebnis der Prüfung, das in Tabelle 19 übersichtlich zusammengestellt ist, möchte ich bemerken, daß sich das verzeichnete Resultat bei Lackmusmolke auf eine 48stündige Beobachtungszeit bezieht, mit Rücksicht auf etwaige, bei dieser Nährlösung leicht auftretende Zersetzungsvorgänge, bei den übrigen Nährmedien dagegen auf eine 8tägige Beobachtungsdauer. Wie aus der genannten Tabelle hervorgeht, zeigen alle Stämme auf den meisten Nährböden (Löffler I und II, Milch, Barsiekow II, Traubenzucker-, Milchzuckerbouillon, Neutralrotagar, Orceinagar) völlig übereinstimmendes Wachstum. Bei Barsiekow I, Lackmusmolke und Hetsch-Lösung treffen wir bei den einzelnen Röhrchen zwar gewisse Differenzen; diese bedeuten indessen nur graduelle Abstufungen der betreffenden Reaktionen und sind nicht spezifisch für eine bestimmte Kolonienart der mutierten Stämme. Daß gewisse Unterschiede im kulturellen Verhalten auf den zuckerhaltigen Nährmedien bei den verschiedenen Typhusstämmen ziemlich häufig auch sonst vorkommen können, habe ich wiederholt beobachtet. Auch in der Literatur finden sich über ein unterschiedliches Wachstum der einzelnen Typhuskulturen auf den genannten Nährsubstraten vereinzelte Mitteilungen.

Tabelle

Nummer	Bezeichnung der Kultur	Löffler I	Löffler II	Barsiekow I	Barsiekow II
1	Typhus Kersten gelb	Koagulation	unverändert	Rötung und Trübung	unverändert
	„ „ hell	„	„	Rötung und Koagulation	„
2	„ 234 gelb	„	„	Rötung und Trübung	„
	„ 234 hell	„	„	Rötung und starke Koagulation	„
3	„ 194 gelb	„	„	Rötung und Koagulation	„
	„ 194 hell	„	„	Rötung und Trübung	„
4	„ Krause gelb	„	„	„	„
	„ „ hell	„	„	Rötung und Koagulation	„
5	„ Stettin trübe, glattrandige Kolonien	„	„	Rötung und Trübung	„
	Typhus Stettin hell, bröckelig	„	„	„	„
6	Typhus T trübe, glattrandig	geringe Koagulation	„	geringe Rötung und Trübung	„
	Typhus T hell, bröckelig	„	„	„	„
7	Typhus Breinsch hell, glattrandig	„	„	Rötung u. gerinnbare Koagulation	„
	Typhus Breinsch scharfzackig und aufgefasert	„	„	„	„

Die agglutinatorischen Verhältnisse der verschiedenen Mutationstypen wurden ebenfalls an einer größeren Anzahl von Kulturen eingehender untersucht. Zur Verwendung kam ein mit Typhus 234 hergestelltes Eselserum vom Titer 1:20000; das Resultat ist in Tabelle 20 zusammenfassend dargestellt. Wie dies bei den Typhusstämmen wiederholt beschrieben ist, sehen wir auch hier bei den einzelnen Kulturen beträchtliche Schwankungen der Agglutinabilität, und zwar treten diese Differenzen ohne Rücksicht auf den Typus des Mutationsbildes, bezw. auf die Art der betreffenden Varietät hervor. So zeigen beispielsweise Typhus 194 hell und Typhus 234 gelb, sowie Typhus T trüb, glattrandig und Typhus Herero hell, bröckelig, die ja in bezug auf Kolonieform direkte Gegensätze bedeuten, übereinstimmend den gleich niedrigen Agglutinationstiter von 1:5000, andererseits werden Typhus Kersten hell und gelb, Typhus Breinsch weinblattförmig und glattrandig, gleichmäßig bis zur Titergrenze stark agglutinatorisch beeinflußt.

19.

Lackmus-molke	Hetsch	Milch	Trauben-zucker	Milch-zucker	Neutralrot-agar	Orceïn
			Bouillon			
Rötung	Rötung und geringe Trübung	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert	unverändert
starke Rötung	Rötung und Koagulation	„	„	„	„	„
„	Rötung und Trübung	„	„	„	„	„
„	Rötung und Koagulation	„	„	„	„	„
Rötung	Rötung und Trübung	„	„	„	„	„
„	„	„	„	„	„	„
geringe Rötung	Rötung und Koagulation	„	„	„	„	„
starke Rötung	„	„	„	„	„	„
Rötung	Rötung und Trübung	„	„	„	„	„
„	„	„	„	„	„	„
starke Rötung	Rötung und Koagulation	„	„	„	„	„
„	„	„	„	„	„	„
Rötung	„	„	„	„	„	„
„	„	„	„	„	„	„

Die bei einzelnen Stämmen z. B. Typhus 234 durchgeführte Virulenzprüfung, sowie der Pfeiffersche Versuch ließen keine nennenswerten Unterschiede zwischen den einzelnen Mutationsstämmen einer Typhuskultur erkennen.

Zusammengefaßt ergeben die Untersuchungen bei Typhus ähnlich wie bei Cholera bei fast allen von mir geprüften Stämmen in annähernd gesetzmäßiger Weise das Auftreten von Mutationsvorgängen. Unterschiede gegenüber den Verhältnissen bei Cholera machten sich allerdings insofern geltend als:

1. Die Mutation der Typhusstämme erst nach längerem Stehen (2—3 Monate mindestens) der Agarkulturen einsetzt, und bei den isolierten Kolonienarten einer Kultur entsprechend spät auch erst wieder atavistische Rückschläge auftreten.

2. Es finden sich bei Typhus nicht wie bei den Choleravibrionen nur 3 verschiedenartige Kolonieformen, sondern es bestehen nach den bisherigen Untersuchungen 3 Mutationsgruppen, von denen jede wieder 2 verschiedene Kolonienarten aufweist.

Tabelle 20. Agglutination mit Typhus-Eselserum vom Titer 1 : 20 000.

Nr.	Bezeichnung der Kultur	Serumverdünnung				Kochsalzkontrolle
		1 : 1000	1 : 5000	1 : 10 000	1 : 20 000	
1	Typhus Kersten hell	++	++	++	++	—
	„ „ gelb	++	++	++	++	—
2	Typhus 194 hell	++	++	+	—	—
	„ 194 gelb	++	++	++	++	—
3	Typhus 234 hell	++	++	++	+	—
	„ 234 gelb	++	++	+	—	—
4	Typhus Krause hell	++	++	++	++	—
	„ „ gelb	++	++	++	++	—
5	Typhus Stettin trüb, glattrandig .	++	++	++	+	—
	„ „ hell, bröckelig .	++	++	++	+	—
6	Typhus T. trüb, glattrandig . .	++	+	+	—	—
	„ „ hell, bröckelig . . .	++	++	++	++	—
7	Typhus Herero trüb, glattrandig .	++	++	++	++	—
	„ „ hell, bröckelig .	++	++	+	—	—
8	Typhus Huber trüb, glattrandig .	++	++	++	++	—
	„ „ hell, bröckelig .	++	++	+	—	—
9	Typhus Gläwe hell, glattrandig .	++	++	++	+	—
	„ „ aufgefasert, scharfzeckig	++	++	++	++	—
10	Typhus Breinsch hell, glattrandig	++	++	++	++	—
	„ „ aufgefasert, scharfzeckig	++	++	++	++	—

3. Es besteht dabei offenbar keine absolute Konstanz des Mutationsbildes bei den einzelnen Typhusstämmen, insofern als Typhuskulturen, die früher bei der Mutation in Kolonien gewachsen waren, wie ich sie als charakteristisch für die 1. Mutationsgruppe beschrieben habe, bei einer späteren Prüfung dann Kolonien entwickeln können, die dem Bild der 2., bezw. 3. Mutationsgruppe entsprechen. Umgekehrt können auch Typhusstämme, die einer der beiden letztgenannten Mutationsgruppen angehören, gelegentlich bei einer späteren Untersuchung in Form von Kolonien mutieren, wie sie für die Kulturen der 1. Mutationsgruppe typisch sind. Immerhin findet sich ein derartiger Wechsel des Mutationstyps bei ein und derselben Typhuskultur anscheinend ziemlich selten.

4. Endlich bleiben nicht nur die morphologischen Differenzen der die verschiedenen Kolonienarten zusammensetzenden Bakterien, sondern auch die charakteristischen Unterschiede der differenten Kolonien der Agarplatte bei Typhus nach der Überimpfung auf dem Drigalskischen Lackmus-Laktose-Agar deutlicher wie bei Cholera erhalten.

IV. Paratyphus.

Zu ähnlichen Ergebnissen wie die Untersuchungen über die Mutationsvorgänge bei Typhus führte die Prüfung der Paratyphus-Kulturen. Auch bei den verschiedenen Stämmen der Paratyphus-Gruppe lassen sich auf Grund des verschiedenartigen Mutations-

bildes der Kolonieformen bestimmte Gruppen abgrenzen. Eine Anzahl Paratyphus B-Kulturen unserer Sammlung, von denen ich Paratyph. B, Paratyph. Schottmüller, Paratyph. Hellwig, Paratyph. Lange, Paratyph. Busse anführen möchte, wachsen z. B. auf der Agarplatte einerseits in kleinen, homogenen, glattrandigen, schwach irisierenden Kolonien andererseits in großen, trüben, aufgefaserten, weinblattförmigen Scheiben, wie sie in den Abbildungen 2 der Tafel VII wiedergegeben sind. Auch hier finden wir wieder entsprechend den differenten Kolonien deutliche morphologische Unterschiede bei den Bakterien, aus denen sich die Kolonien zusammensetzen. So bestehen die kleinen, glattrandigen Formen, wie aus Fig. 5 der Tafel IX ersichtlich ist, aus kurzen, dicken, plumpen Stäbchen, während die großen, aufgefaserten, weinblattförmigen Kolonien — ein Mutationsbild, das an die Verhältnisse bei der dritten Gruppe von Typhuskulturen erinnert — von längeren, schlanken Bazillen gebildet werden (Fig. 6. T. IX). Eine zweite Gruppe von Paratyphus-Stämmen, zu denen unter anderen Paratyph. Greifswald, Paratyph. England, Paratyph. Tietz, Paratyph. Storch gehören, entwickelt bei der Aussaat auf der Agarplatte neben hellen, bei durchscheinendem Lichte schwach bläulich schimmernden Kolonien gleichzeitig auch mehr trübe, schmutzig-weiße, bei durchfallendem Lichte häufig schwach gelbrötlich scheinende Scheiben. Diese setzen sich aus sehr kurzen, dicken, plumpen, kokkenähnlichen Bakterien zusammen, während die hellen, durchscheinenden Kolonien dagegen aus kurzen, mittelschlanken Stäbchen bestehen.

Ganz abweichend von dem bisher geschilderten Verhalten der aus Menschen isolierten Paratyphuskulturen war hinsichtlich der Mutation das eines Psittacosis-Stammes. Hier traten auf der Agarplatte nach der Aussaat aus alten Agarröhrchen Kolonieformen auf, die sowohl bezüglich ihres Aussehens wie auch nach ihrem weiteren Verhalten mit den Mutationsformen des Bac. enterid. Gaertner, auf die später noch näher einzugehen sein wird, große Ähnlichkeit aufwiesen. Es entwickelten sich nämlich einerseits helle, durchscheinende Kolonien, andererseits saftige, eigentümlich perlmutterartig glänzende, trübere Formen. Während aber die früher beschriebenen, isolierten Varietäten der mutierten Paratyphuskulturen eine gewisse Konstanz zeigen, so daß sich auch aus den isoliert weitergezüchteten Kulturen selbst nach Monate langem Stehen der Agarröhrchen bei der Überimpfung auf Agarplatten häufig noch nur die speziellen Kolonieformen allein entwickeln, setzen bei den isolierten Mutationsarten des Psittacosis-Stammes die Mutationsvorgänge schon früher ein, bei den hellen Kolonien meist schon nach Ablauf weniger Wochen, bei den perlmutterartig glänzenden, irisierenden dagegen sogar bereits innerhalb 24 Stunden. Freilich vollziehen sich diese Wachstumserscheinungen auch bei der letztgenannten Art in der Weise, daß auf den beimpften Agarplatten überwiegend Kolonien der irisierenden, trüberen Varietät und nur vereinzelt helle, durchscheinende Scheiben zur Entwicklung kommen. Läßt man ferner diese Platten einige Tage stehen, so bemerkt man, daß sich um die perlmutterartig glänzenden Kolonien ein heller, durchscheinender Hof von täglich steigendem Durchmesser bildet, so daß sich nach einiger Zeit große Kolonien mit breitem, hellem Ring und einem stark lichtbrechenden, eigenartig glänzenden Zentrum gebildet haben. Impft man von dem hellen Koloniensaum auf Agarplatten über, so entwickeln sich ausschließlich

helle, durchscheinende Kolonien; wählt man dagegen als Ausgangsmaterial das perlmutterartig glänzende Zentrum einer Kolonie, so wachsen nach der Aussaat auf den Platten überwiegend diese trüberen, irisierenden Kolonien und daneben nur ganz vereinzelte helle Formen. Die hellen Kolonien besitzen eine ausgesprochene Konstanz und mutieren nicht weiter bei Überimpfung in kurzen Zwischenräumen. Anders ist es bei den trüben, irisierenden Formen; diese entwickeln bereits innerhalb 24 Stunden bei Weiterimpfung auf Agar wieder neben zahlreichen, dem Ausgangsmaterial entsprechenden Kolonien noch vereinzelte helle, durchscheinende Scheibchen. Den verschiedenartigen Kolonien der mutierenden Stämme entsprechen auch hier wieder deutliche morphologische Differenzen bei den Bakterien, aus denen sich jeweils die Kolonien zusammensetzen. Die hellen, durchscheinenden Kolonien werden von sehr kurzen, ziemlich schlanken, geraden Stäbchen gebildet, die trüberen, perlmutterartig glänzenden bestehen aus längeren, plumpen, geraden Bazillen.

Was nun das Verhalten hinsichtlich der Mutation bei noch einigen anderen der Hogcoleragruppe zugehörigen Bakterien anlangt, so prüfte ich weiterhin nach dieser Richtung zunächst eine Anzahl von Kulturen des Bac. suipestifer, sowie einzelne aus Nahrungsmitteln gewonnene Stämme. Dabei ergab es sich, daß die Mehrzahl der Bac. suipestifer-Kulturen Mutationserscheinungen aufweist, wie ich sie bei den aus dem Menschen isolierten Paratyphuskulturen geschildert habe. Wir finden also bei dem Einsetzen der genannten Vorgänge nach der Aussaat auf der Agarplatte bei verschiedenen Bac. suipestifer-Stämmen, von denen ich beispielsweise Bac. suipestifer I und 271 anführen möchte, einmal große, weinblattförmige, aufgefaserte Kolonien und dann noch kleine, glattrandige, hellere Formen. Auch hier sind die morphologischen Differenzen bei den Bakterien, von denen jeweils die verschiedenen Kolonien gebildet werden, deutlich ausgeprägt: die helleren, kleinen, glattrandigen Kolonien bestehen aus kurzen, dicken, plumpen Stäbchen, die großen, aufgefaserten Kolonieformen setzen sich aus längeren, schlankeren Individuen zusammen. Eine zweite Gruppe der Bac. suipestifer-Kulturen, z. B. Bac. suipestifer 22, 270, 417, 442, 468, 506, mutiert nach dem Ausstreichen auf der Agarplatte dagegen wieder in Form von hellen, durchscheinenden Kolonien, die aus kurzen oder mittellangen, ziemlich schlanken, geraden Stäbchen bestehen, und weiterhin in Form von mehr trüben, undurchsichtigen, bei durchfallendem Lichte häufig schwach gelbrötlich schimmernden Scheiben, die sich aus sehr kurzen, dicken, plumpen, oft kokkenähnlichen Bakterien zusammensetzen. Eine weitere Gruppe endlich von Bac. suipestifer-Stämmen, darunter Bac. suipest. Drüe und Bac. suipest. 459, zeigen Mutationsformen, die mit denen bei Psittacosis eine gewisse Ähnlichkeit haben. Bei Überimpfen dieser Kulturen aus alten Agarröhrchen auf Agarplatten entwickeln sich nämlich einmal mittelgroße helle, durchscheinende Kolonien und ferner ziemlich kleine, irisierende, mehr trübe, perlmutterartig glänzende Scheibchen. Es bestehen auch hier zwischen den Bakterien, aus denen sich die beiden Kolonienarten zusammensetzen, weitgehende morphologische Differenzen. Den hellen Kolonien entsprechen sehr kurze, ziemlich feine Stäbchen, die perlmutterartig glänzenden Kolonien werden von längeren, plumperen Bazillen gebildet. Wie bei dem Bac. Psittacosis, bezw. bei den Gärtnerstämmen treten auch bei der in dieser

Weise mutierenden Gruppe der Pestiferstämme die Mutationsvorgänge nach Isolierung der speziellen Kolonieformen schon sehr bald wieder auf, bei der hellen Kolonienart meist nach wenigen Wochen, bei der perlmutterartig glänzenden Varietät bereits innerhalb 24 Stunden. Läßt man die mit den irisierenden Kolonien beimpfte Agarplatte einige Tage stehen, so bildet sich auch hier um die perlmutterartig glänzenden Kolonien ein heller, durchscheinender Ring von ständig wachsendem Durchmesser, und wenn man von dieser hellen Randzone der trüben Kolonie weiter auf Agarplatten impft, so entwickeln sich ebenfalls nur helle, durchscheinende Kolonien. Von der perlmutterartig glänzenden Varietät des Psittacosis-Stammes, bezw. der Bac. enterid. Gaertner-Kulturen unterscheiden sich diese trüben Kolonien der dritten Mutationsgruppe von Bac. suipestifer jedoch durch ihre geringe Größe und durch ihre trockene, spröde Beschaffenheit im Gegensatz zu dem klebrigen, fadenziehenden Verhalten bei den entsprechenden Kolonien des Bac. Psittacosis und der Gärtner-Stämme.

Die zu den Untersuchungen herangezogenen, aus Nahrungsmitteln gewonnenen Stämme der Hogcholeragruppe, z. B. Paratyph. Salami, Paratyph. Wurst, Paratyph. Salami B bildeten beim Einsetzen der Mutation auf der Agarplatte teils helle, durchscheinende Kolonien, teils mehr trübe, undurchsichtige Scheiben. Sie mutierten also nach Art der zweiten Mutationsgruppe der aus Menschen isolierten Paratyphus B-Stämme. Eine Kultur des Bac. Aertryk, ferner drei Mäusetyphus-Stämme und ein der Hogcholera-Gruppe zugehöriger Kälberruhr-Stamm zeigten dagegen auf der Agarplatte ein dem ersten Mutationstyp der menschlichen Paratyphus-Kulturen entsprechendes Verhalten. Sie bildeten kleine, glattrandige, helle Kolonien und daneben größere, weinblattförmige, trübere Scheiben. Bei all diesen Mutationsstämmen sind ebenfalls die bereits oben eingehend beschriebenen, morphologischen Differenzen der Bakterien, aus denen sich die verschiedenartigen Kolonien zusammensetzen, deutlich ausgeprägt.

Die bei der Untersuchung verwendeten Kulturen der Hogcholera-Gruppe sind unter gleichzeitiger Angabe ihrer Herkunft und ihrer Mutationsformen in Tabelle 21 (S. 468) übersichtlich zusammengestellt.

Kurz zusammengefaßt erhalten wir sonach folgende Ergebnisse:

Bei den zur Untersuchung herangezogenen Stämmen der Hogcholera-Gruppe lassen sich hinsichtlich der Mutation drei besondere Gruppen abgrenzen, nämlich

1. Mutationsgruppe: Stämme, die teils in Form von großen, trüben, aufgefaserten, teils von kleinen, hellen, glattrandigen Kolonien mutieren und Ähnlichkeit mit den Kulturen der dritten Mutationsgruppe bei Typhus aufweisen z. B. Paratyph. Hellwig, Paratyph. Schottmüller, Bac. suipestifer I, Aertryk.

2. Mutationsgruppe: Stämme, welche in hellen, durchscheinenden und trüben, undurchsichtigen Kolonien mutieren und im Aussehen der Kolonien der Mutationsgruppe 2 bei Typhus entsprechen z. B. Paratyph. Greifswald, Paratyph. Tietz, Bac. suipestifer 270, 417, 688, Paratyph. Salami.

3. Mutationsgruppe: Stämme, welche teils in Form von hellen, durchscheinenden, teils in Form von trüben, perlmutterartig glänzenden Kolonien mutieren und hinsichtlich des Mutationsbildes der Kolonien den Bac. enterid. Gaertner-Stämmen gleichen z. B. Bac. Psittacosis, Bac. suipestifer Drüe und Bac. suipestifer 459.

Tabelle 21.

Nr.	Bezeichnung der geprüften Stämme	Herkunft der Stämme	Aussehen der Kolonien bei den mutierten Stämmen	
			1. Varietät	2. Varietät
1	Paratyphus B K. G. A.	aus menschlichem Darm isoliert	groß, aufgefasert	klein, glattrandig
2	„ Hellwig	„	„	„
3	„ Schottmüller	„	„	„
4	„ Runge	„	„	„
5	„ Lange	„	„	„
6	„ Busse	„	„	„
7	„ B 217	„	„	„
8	„ Storch	„	hell, durchscheinend	trüb, undurchsichtig
9	„ Kozuschek	„	„	„
10	„ Greifswald	„	„	„
11	„ Tietz	„	„	„
12	„ England	„	„	„
13	Bac. suipestifer I	aus dem Darm eines schweinepestkrank. Schweines gezüchtet	groß, aufgefasert	klein, glattrandig
14	„ „ 271	„	„	„
15	„ „ II	„	hell, durchscheinend	trüb, undurchsichtig
16	„ „ III	aus Milz eines schweinepestkrank. Schweines isoliert	„	„
17	„ „ 22	aus Darm eines schweinepestkrank. Schweines gezüchtet	„	„
18	„ „ 270	„	„	„
19	„ „ Harnstoff	—	„	„
20	„ „ 417	aus Darm eines schweinepestkrank. Schweines isoliert	„	„
21	„ „ 468	„	„	„
22	„ „ 506	„	„	„
23	„ „ 442	„	„	„
24	„ „ 200	„	„	„
25	„ „ 564	„	„	„
26	„ „ 688	„	„	„
27	„ „ 459	aus Lunge eines schweinepestkranken Schweines isoliert	„	trüb, trocken, perlmutterartig glänzend
28	„ „ Drüe	aus schweinepestkrankem Schweine gezüchtet	„	„
29	Paratyphus Salami	aus Salami gezücht.	hell, durchscheinend	trüb, undurchsichtig
30	„ „ Borchmann	„	„	„
31	„ Wurst	aus Wurst gezüchtet	„	„
32	„ Aertryk	aus Fleisch einer notgeschlachteten Kuh gezüchtet	groß, aufgefasert	klein, glattrandig
33	„ Kälberruhr	aus den Organen eines ruhrkranken Kalbes gezüchtet	„	„
34	Mäusetyphus I	—	„	„
35	„ P	—	„	„
36	„ Löffler	—	„	„
37	Psittacosis	—	hell, durchscheinend	trüb, saftig, perlmutterartig glänzend

Auch bei den Stämmen der Hogcholera-Gruppe bilden die mutierten Arten auf anderen Nährböden, wie Malachitgrünagar, Gelatine, keine nennenswerten Differenzen in der Kolonieform; es lassen sich aber auch auf diesen Nährböden die morphologischen Unterschiede der Bakterien bei den differenten Mutationsarten feststellen.

Auf der Drigalskischen Blauplatte dagegen kann man wieder die verschiedenen Kolonien deutlich voneinander abgrenzen: Die auf der Agarplatte in Form großer, zerfließender, weinblattförmiger Kolonien wachsenden Mutationsstämme entwickeln auf dem Lackmus-Laktose-Agar entsprechend aussehende ziemlich große Kolonien, die hier einen weißblauen Farbenton besitzen; der anderen Kolonienart, also den kleinen, hellen, glattrandigen Scheibchen der Agarplatte, entsprechen auf dem Drigalskischen Nährboden zarte, glattrandige, durchscheinende Kolonien von fast violetter Färbung. Bei dem zweiten Mutationstyp der Paratyphus-Kulturen finden wir auf der Blauplatte einmal zartere, mehr durchscheinende, gewöhnlich dunkler aussehende Scheibchen, welche den hellen, durchscheinenden Kolonien der Agarplatte entsprechen, und dann noch saftigere, trübe, häufig weißblau gefärbte Kolonien, welche auf der Agarplatte als trübe, undurchsichtige Formen sich darstellen. Die Unterschiede im Farbenton der differenten Kolonien sind aber im allgemeinen nicht immer stark ausgeprägt und nicht stets ausgesprochen charakteristisch, während die Form der Kolonien und ihre sonstige Beschaffenheit z. B. trockenes oder feuchtes Aussehen derselben konstant bleiben. Die dritte Mutationsgruppe, zu welcher der erwähnte Psittacosis-Stamm gehört, und zu der auch die Kulturen Bac. suipestif. Drüe und Bac. suipestif. 459 zuzurechnen sind, bewahrt auf dem Drigalskischen Nährboden das charakteristische Aussehen der Kolonieformen bei den von der Agarplatte überimpften, isolierten Varietäten nicht so deutlich, während die bedeutenden morphologischen Differenzen der Bakterien auch bei der Übertragung auf den Lackmus-Laktose-Agar keine Abschwächung erfahren, ebensowenig wie bei Verwendung anderer fester Nährböden.

Wie ich bereits bei Typhus beobachten konnte, mutieren auch bei der Hogcholeragruppe einzelne Stämme nicht immer in der gleichen Weise. So wuchs z. B. Paratyph. Tietz, der vor etwa Jahresfrist beim Einsetzen der Mutationsvorgänge helle, durchscheinende und daneben trübe, undurchsichtige, bei durchfallendem Licht gelbrötlich schimmernde Kolonien von gleicher Größe auf der Agarplatte gebildet hatte, als ich nach längerer Zeit wiederum aus einem mehrere Monate alten Agarröhrchen Ausstriche auf Agarplatten anlegte, jetzt auf diesem Nährboden nach Art der Stämme aus der ersten Mutationsgruppe in Form von hellen, kleinen glattrandigen Kolonien und dann in Form von großen, trüben, weinblattförmigen Scheiben. Immerhin fand sich ein derartiger Wechsel des Mutationstyps bei den genannten Stämmen doch recht selten, niemals aber bei den Kulturen, die ähnlich wie die Gaertner-Bakterien mutieren. Im Gegensatz zur Cholera und in Übereinstimmung mit Typhus treten die Mutationsvorgänge bei der 1. und 2. Mutationsgruppe der Hogcholerastämme erst ziemlich spät auf, gewöhnlich, wenn die beimpften Agarröhrchen schon mehrere Monate gestanden haben; dementsprechend ist auch bei den isolierten Varietäten des Paratyphus der Wiederbeginn der Mutationserscheinungen erst dann zu beobachten, wenn die ge-

Tabelle

Nummer	Bezeichnung der Kultur	Löffler I	Löffler II	Barsiekow I	Barsiekow II
1	Paratyphus B K. G. A. klein, glattrandig	Koagulation	Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Paratyphus B K. G. A. groß, aufgefasert	„	„	„	geringe Blaufärbung
2	Paratyphus Hellwig klein, glattrandig	Koagulation	starke Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Paratyphus Hellwig groß, aufgefasert	„	„	„	„
3	Paratyphus Schottmüller klein, glattrandig	Koagulation	Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	geringe Blaufärbung
	Paratyphus Schottmüller groß, aufgefasert	„	„	„	unverändert
4	Paratyphus Greifswald hell, bläulich schimmernd	Koagulation	Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Paratyphus Greifswald trüb, gelbrötlich schimmernd	„	„	„	„
5	Paratyphus B Lange groß, aufgefasert	starke Koagulation	Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Paratyphus B Lange klein, glattrandig	„	„	„	„
6	Paratyphus B Busse groß, aufgefasert	starke Koagulation	Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Paratyphus B Busse klein, glattrandig	„	„	„	„
7	Paratyphus B Storch hell, bläulich schimmernd	starke Koagulation	Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Paratyphus B Storch trüb, rötlich schimmernd	„	„	„	„
8	Paratyphus B Kozuschek hell, bläulich schimmernd	Koagulation	Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Paratyphus B Kozuschek trüb, rötlich schimmernd	„	„	„	„
9	Paratyphus B 217 klein, glattrandig	Koagulation	Aufhellung, leichte Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Paratyphus B 217 groß, aufgefasert	„	„	„	„
10	Paratyphus B Tietz hell, bläulich schimmernd	Koagulation	Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Paratyphus B Tietz trüb, rötlich schimmernd	„	„	„	„

22.

Lackmusmolke	Hetsch	Milch	Traubenzucker-Bouillon	Milchzucker-Bouillon	Neutralrotagar	Orceïnagar
Blaufärbung	Rötung, Koagulation u. Trübung	starke Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung, Gasbildung, Fluoreszenz	Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Blauviolettfärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	geringe Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	geringe Entfarbung, Gasbildung und Fluoreszenz	mäßige Aufhellung
tiefe Blaufärbung	„	„	„	„	„	„
Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	geringe Entfärbung und Gasbildung	mäßige Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
tiefe Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung, Gasbildung, Fluoreszenz	Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
starke Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	geringe Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung, Gasbildung	geringe Aufhellung
„	„	„	„	„	Entfärbung, Gasbildung, Fluoreszenz	unverändert
Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung, Gasbildung, Fluoreszenz	unverändert
„	„	„	„	„	„	geringe Aufhellung
Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung, Gasbildung	unverändert
„	„	„	„	„	„	„
starke Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung, Gasbildung, Fluoreszenz	mäßige Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	starke Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung, Gasbildung, Fluoreszenz	Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	starke Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung, Gasbildung, Fluoreszenz	geringe Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„

Nummer	Bezeichnung der Kultur	Löffler I	Löffler II	Barsiekow I	Barsiekow II
11	Paratyphus B England hell, bläulich schimmernd	Koagulation	Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Paratyphus B England trüb, rötlich schimmernd	„	„	„	„
12	Bac. suipestifer I klein, glattrandig	Koagulation	Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	geringe Blaufärbung
	Bac. suipestifer I groß, aufgefasert	„	„	„	unverändert
13	Bac. suipestifer II hell, durchscheinend	Koagulation	starke Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Bac. suipestifer II trüb, milchigweiß	„	„	„	„
14	Bac. suipestifer III hell, durchscheinend	Koagulation	starke Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Bac. suipestifer III trüb, undurchsichtig	„	„	„	„
15	Bac. suipestifer 22 hell, durchscheinend	Koagulation	Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Bac. suipestifer 22 trüb, undurchsichtig	„	„	„	„
16	Bac. suipestifer 564 hell, durchscheinend	Koagulation	Aufhellung und leichte Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Bac. suipestifer 564 trüb, undurchsichtig	„	„	„	„
17	Bac. suipestifer 200 hell, durchscheinend	Koagulation	Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Bac. suipestifer 200 trüb, undurchsichtig	„	„	„	„
18	Bac. suipestifer 270 hell, durchscheinend	Koagulation	starke Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Bac. suipestifer 270 trüb, undurchsichtig	„	„	„	„
19	Bac. suipestifer 271 klein, glattrandig	Koagulation	mäßige Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Bac. suipestifer 271 groß, aufgefasert	„	stark. Aufhellung und Trübung	„	„
20	Bac. suipestifer Harnstoff hell, durchscheinend	Koagulation	starke Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Bac. suipestifer Harnstoff trüb, undurchsichtig	„	„	„	„

Lackmus-molke	Hetsch	Milch	Trauben-zucker- Bouillon	Milch-zucker- Bouillon	Neutral-rotagar	Orzeïnagar
Blaufärbung	Rötung, Koagulation und Gasbildung	Starke Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung	geringe Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Blaufärbung	Rötung, Koagulation und Gasbildung	starke Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung, Gasbildung, Fluoreszenz	mäßige Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Tiefe Blaufärbung	Rötung, Koagulation und Gasbildung	starke Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung, Gasbildung, Fluoreszenz	geringe Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Tiefe Blaufärbung	Rötung, Koagulation und Gasbildung	Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung, Gasbildung, Fluoreszenz	Aufhellung
Mäßige Blaufärbung	„	„	„	„	„	„
Tiefe Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	starke Aufhellung, Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung, Gasbildung, Fluoreszenz	geringe Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	starke Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung, Gasbildung, Fluoreszenz	Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Tiefe Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung, Gasbildung, Fluoreszenz	geringe Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Tiefe Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	starke Gasbildung, Entfärbung u. Fluoreszenz	geringe Aufhellung
Violettfärbung	„	„	„	„	„	„
Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung, Gasbildung, Fluoreszenz	geringe Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Tiefe Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung, Gasbildung, Fluoreszenz	geringe Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„

Nummer	Bezeichnung der Kultur	Löffler I	Löffler II	Barsiekow I	Barsiekow II
21	Bac. suipestifer 417 hell, durchscheinend	Koagulation	starke Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Bac. suipestifer 417 trüb, undurchsichtig	„	„	„	„
22	Bac. suipestifer 442 hell, durchscheinend	Koagulation	Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Bac. suipestifer 442 trüb, undurchsichtig	„	„	„	„
23	Bac. suipestifer 468 hell, durchscheinend	Koagulation	Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Bac. suipestifer 468 trüb, undurchsichtig	„	„	„	„
24	Bac. suipestifer 506 hell, durchscheinend	Koagulation	starke Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Bac. suipestifer 506 trüb, undurchsichtig	„	„	„	„
25	Bac. suipestifer 688 hell, durchscheinend	Koagulation	starke Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Bac. suipestifer 688 trüb, undurchsichtig	„	„	„	„
26	Bac. suipestifer 459 hell, durchscheinend	Koagulation	Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Bac. suipestifer 459 perlmutterglänzend	„	„	„	„
27	Bac. suipestifer Drüe hell, durchscheinend	Koagulation	Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Bac. suipestifer Drüe perlmutterglänzend	„	starke Aufhellung und Trübung	„	„
28	Paratypus Salami hell, durchscheinend	Koagulation	starke Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Paratyphus Salami trüb, undurchsichtig	„	„	„	„
29	Paratyphus Salami Borchmann hell, durchscheinend	starke Koagulation	starke Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Paratyphus Salami Borchmann trüb, undurchsichtig	„	Sehr schwache Aufhellung und Trübung	„	„
30	Paratyphus Wurst hell, durchscheinend	Koagulation	Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Paratyphus Wurst trüb, undurchsichtig	„	„	„	„

Lackmus-molke	Hetsch	Milch	Trauben-zucker	Milch-zucker	Neutral-rotagar	Orzeïnagar
			Bouillon			
Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Gasbildung, Entfärbung, Fluoreszenz	unverändert
„	„	„	„	„	„	mäßige Aufhellung
Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Gasbildung, Entfärbung, Fluoreszenz	geringe Aufhellung
„	„	„	„	„	„	unverändert
Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Gasbildung, Entfärbung, Fluoreszenz	geringe Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
tiefe Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	Starke Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Gasbildung, Entfärbung, Fluoreszenz	mäßige Aufhellung
„	„	„	„	„	Gasbild. ger. Entfärbung	„
Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Gasbildung, Entfärbung, Fluoreszenz	unverändert
„	„	„	„	„	„	„
Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverandert	Gasbildung, Entfärbung, Fluoreszenz	Aufhellung
„	„	„	„	„	„	unverändert
Rotviolett-färbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	starke Entfärb.,Gasbild. Fluoreszenz	starke Aufhellung
Blaufärbung	Rötung, Koagulation	„	„	„	„	„
Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Gasbildung, Entfärbung, Fluoreszenz	geringe Aufhellung
„	„	„	„	„	„	unverändert
Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Gasbildung, Entfärbung, Fluoreszenz	unverändert
„	„	„	„	„	„	„
Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	starke Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Gasbildung, Entfärbung, Fluoreszenz	Aufhellung
„	„	geringe Aufhellung und Alkalisierung	„	„	„	„

Nummer	Bezeichnung der Kultur	Löffler I	Löffler II	Barsiekow I	Barsiekow II
31	Aertryk groß, aufgefasert	Koagulation	Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Aertryk klein, glattrandig	"	"	"	"
32	Kälberruhr K. G. A. groß, aufgefasert	Koagulation	Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Kälberruhr K. G. A. klein, glattrandig	"	"	"	"
33	Mäusetyphus I groß, aufgefasert	Koagulation	Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Mäusetyphus I klein, glattrandig	"	"	"	"
34	Mäusetyphus P groß, aufgefasert	Koagulation	Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Mäusetyphus P klein, glattrandig	"	"	"	"
35	Mäusetyphus Löffler groß, aufgefasert	Koagulation	Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Mäusetyphus Löffler klein, glattrandig	"	"	"	"
36	Psittacosis hell, durchscheinend	Koagulation	Aufhellung und Trübung	Rötung und Koagulation	unverändert
	Psittacosis trüb, perlmutterartig glänzend	"	"	"	"

trennt fortgezüchteten, verschiedenen Kolonieformen in den Agarröhrchen ohne Zwischenimpfung mehrere Monate lang gewachsen waren. Bei der 3. Mutationsgruppe des Paratyphus haben nur die isolierten hellen, durchscheinenden Kolonieformen eine gewisse Konstanz in der Dauer von einigen Wochen, während die Bakterien der perlmutterartig glänzenden, trüberen Kolonienart innerhalb 24 Stunden stets aufs neue mutieren.

Um über das Verhalten der verschiedenen Mutationsformen bei den Bakterien der Hogcholeragruppe auf anderen Nährsubstraten noch Aufschluß zu bekommen, wurden ähnlich wie bei Typhus auch bei diesen Stämmen die Differentialnährböden in der gleichen Zusammensetzung herangezogen. Das Ergebnis der Untersuchung ist in der vorstehenden Tabelle 22 übersichtlich zusammengestellt.

Wie bei den Typhuskulturen finden wir auch hier auf der Mehrzahl der Nährböden im allgemeinen völlige Übereinstimmung der Reaktionen. Es machen sich beim Vergleich der einzelnen Hogcholerastämme untereinander wie auch bei dem Vergleich der einzelnen Mutationsformen geringe graduelle, aber keine spezifisch ausgesprochenen Schwankungen geltend. Barsiekow II-Lösung zeigt mitunter geringe Blau-

Lackmus-molke	Hetsch	Milch	Bouillon		Neutral-rotagar	Orzeïnagar
			Trauben-zucker	Milch-zucker		
Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung, Gasbildung, Fluoreszenz	Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung, Gasbildung, Fluoreszenz	geringe Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	starke Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Geringe Entfärbung, Gasbildung,	mäßige Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	starke Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung, Gasbildung, Fluoreszenz	Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
tiefe Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung, Gasbildung, Fluoreszenz	Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Blaufärbung	Rötung, Koagulation, Gasbildung	Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung, Gasbildung, Fluoreszenz	geringe Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„

färbung, die jedoch nicht an eine bestimmte Mutationsform gebunden ist. Die Resultate wurden nach 8tägiger Beobachtung festgelegt; infolgedessen kommt in der Tabelle hinsichtlich des Farbenumschlages der Lackmusmolke die oft beträchtliche Zeitdifferenz im Auftreten dieser Reaktion bei den einzelnen Kulturen, bezw. deren Varietäten nicht entsprechend zum Ausdruck. Es sei deshalb hier kurz erwähnt, daß ich gegenüber den Angaben verschiedener Autoren, wonach der anfangs rötliche Farbenton der beimpften Lackmusmolke nach 2 Tagen in den blauen übergehen soll, bei den 72 von mir geprüften Kulturen bezüglich ihres Verhaltens beträchtliche zeitliche Schwankungen feststellen konnte, die aber für spezielle Mutationsarten nicht charakteristisch sind. Endlich konnte ich bei einigen Kulturen, bezw. bei den einzelnen isolierten Varietäten eine, wenn auch geringe Vergärung des Milchzuckers in Bouillon wahrnehmen, trotzdem es sich um ein chemisch reines Präparat handelt, das von Typhusstämmen in keiner Weise angegriffen wurde. Da aber die Reaktion hier im Vergleich zu der Vergärung in der Traubenzuckerbouillon nur einen ganz geringen Ausschlag aufweist, so wurde sie in der Tabelle nicht weiter berücksichtigt.

Bezüglich des serologischen Verhaltens der verschiedenen Stämme und ihrer

isolierten Mutationsformen wurden die Untersuchungen über die Agglutinabilität der Kulturen nach verschiedenen Richtungen hin durchgeführt. Es wurden zu dieser Prüfung folgende Sera herangezogen:

1. ein Paratyphus B-Eselserum vom Titer 1 : 5000.

2. ein mit der Kultur Typhus 234 gewonnenes Typhus-Eselserum vom Titer 1 : 20000.

3. ein Bac. enterid. Gaertner Kaninchenserum vom Titer 1 : 10000.

4. ein mit Kultur Voldagsen hergestelltes Kaninchen-Immunserum vom Titer 1 : 10000.

Das Paratyphus B-Eselserum wurde benutzt, um festzustellen, ob bei den einzelnen Stämmen durch ein mit einer Kultur aus der Hogcholeragruppe gewonnenes Immunserum die verschiedenen Mutationsformen verschieden stark agglutinatorisch beeinflußt wurden. Durch die Agglutinationsprüfung mittels des Typhus-Eselserums sollte eventuell nachgewiesen werden, ob die Kulturen, welche ähnlich wie die Typhusstämme mutierten, auch in serologischer Beziehung eine gewisse Verwandtschaft mit Typhus erkennen lassen würden. Die Untersuchung mittels des Gaertner-Kaninchenserums sollte Aufschluß darüber geben, ob die Kulturen mit einem den Bac. enterid. Gaertnerstämmen ähnlichen Mutationsbild diesen auch serologisch nahestünden. Das Voldagsen-Kaninchenserum wurde zur Prüfung herangezogen, da nach den Untersuchungen von Haendel, Gildemeister und Teodorascu (12) die Stämme der Hogcholeragruppe durch dieses mittels einer von den gewöhnlichen Paratyphusstämmen kulturell abweichenden Bakterienart gewonnene Immunserum zum Teil hoch agglutiniert, zum Teil nur schwach beeinflußt wurden. Es ließen sich also nach den Mitteilungen der genannten Autoren unter den Stämmen der Hogcholeragruppe zwei im agglutinatorischen Verhalten gegenüber dem Voldagsen-Kaninchenserum stark differente Gruppen unterscheiden. Es schien nun eine weitere Untersuchung darüber angezeigt, ob mit diesem verschiedenen serologischen Verhalten der Kulturen auch ein verschiedenes Verhalten hinsichtlich der Mutationserscheinungen parallel ginge, etwa in der Art, daß Stämme von einem bestimmten Mutationstyp z. B. die der 1. Mutationsgruppe agglutinatorisch von dem genannten Serum höher beeinflußt würden als z. B. die Kulturen der 2. Gruppe oder umgekehrt.

Das Ergebnis dieser verschiedenen Untersuchungen ist in den Tabellen 23—26 (S. 479—483) übersichtlich zusammengestellt.

Was nun zunächst die mittels des Paratyphus B-Serums ausgeführte Prüfung (Tabelle 19) anlangt, so geht aus der Durchsicht der Tabellen hervor, daß bei den Kulturen der ersten Mutationsgruppe die kleinen, glattrandigen Kolonien vielfach z. B. bei Paratyph. Schottmüller, Paratyph. Hellwig, Paratyph. K. G.-A., Paratyph. B. 217, Mäusetyph. I wesentlich geringer (bei Verdünnung 1 : 1000) agglutinatorisch beeinflußt werden als die Kolonien der anderen Mutationsart. Doch findet sich dieses Verhalten nicht durchgängig, da bei anderen Kulturen wieder z. B. bei Paratyphus Lange, Paratyphus Bruse, Paratyphus Runge, Aertryk, Kälberruhr, Mäusetyphus P die beiden Varietäten gleichmäßig hoch, bei Bac. suipestif. I, Bac. suipestif. 271 sogar die großen, aufgefaserten Kolonien weniger hoch als die Bazillen der kleinen, glattrandigen Form

Tabelle 23. Agglutination mit Paratyphus-Eselserum vom Titer 1 : 5000.

Nr.	Bezeichnung der Kultur	Serumverdünnung					Kochsalzkontrolle
		1 : 100	1 : 500	1 : 1000	1 : 3000	1 : 5000	
1	Paratyph. Schottmüller groß, aufgefasert	+++	++	++	++	++	−
	„ „ klein, glattrandig	+++	++	++	−	−	−
2	„ Hellwig groß, aufgefasert . .	+++	+++	++	++	++	−
	„ „ klein, glattrandig .	+++	++	++	−	−	−
3	„ Lange groß, aufgefasert . .	+++	++	++	++	−	−
	„ „ klein, glattrandig . .	+++	++	++	++	−	−
4	„ Busse groß, aufgefasert . .	+++	++	++	++	++	−
	„ „ klein, glattrandig . .	+++	++	++	++	++	−
5	Paratyph. B groß, aufgefasert . . .	+++	++	++	++	+	−
	„ „ klein, glattrandig . . .	++	++	++	−	−	−
6	„ „ Runge groß, aufgefasert .	+++	+++	+++	++	+	−
	„ „ „ klein, glattrandig .	+++	++	+	+	+	−
7	Paratyph. Storch hell, bläul. schimmernd	+++	++	++	+	+	−
	„ „ trüb, gelbrötl. schimmernd	+++	++	++	+	+	−
8	„ Kozuschek hell, bläul. schimm.	+++	++	++	++	++	−
	„ „ trüb, gelbrötl. schimm.	+++	++	++	++	++	−
9	„ Tietz hell, durcheinend . .	++	++	++	++	++	−
	„ „ trüb, undurchsichtig .	++	++	++	++	−	−
10	Paratyph. B 217 groß, aufgefasert . .	++	++	++	++	++	−
	„ „ 217 klein, glattrandig . .	++	++	++	−	−	−
11	Paratyph. Greifswald hell, durchschein.	++	++	++	+	−	−
	„ „ trüb, undurchsichtig	++	++	++	+	−	−
12	„ England hell, durchscheinend	++	++	++	+	−	−
	„ „ trüb, undurchsichtig	++	++	++	+	−	−
13	Bac. suipestifer I groß, aufgefasert . .	++	++	++	++	−	−
	„ „ I klein, glattrandig . .	++	++	++	++	++	−
14	„ „ 271 groß, aufgefasert . .	++	++	++	+	−	−
	„ „ 271 klein, glattrandig . .	++	++	++	++	+	−
15	„ „ II hell, durchscheinend	++	+	±	−	−	−
	„ „ II trüb, undurchsichtig	++	++	++	+	±	−
16	„ „ III hell, durchscheinend	++	++	++	++	++	−
	„ „ III trüb, undurchsichtig	++	++	++	++	++	−
17	„ „ 22 hell, durchscheinend	++	++	++	++	++	−
	„ „ 22 trüb, undurchsichtig	++	++	++	++	++	−
18	„ „ 270 hell, durchscheinend	++	++	++	+	±	−
	„ „ 270 trüb, undurchsichtig	++	++	+	±	−	−
19	„ „ Harnstoff hell, durchschein.	++	++	++	++	++	−
	„ „ „ trüb, undurchsichtig	++	++	++	++	++	−
20	„ „ 417 hell, durchscheinend	++	++	++	++	++	−
	„ „ 417 trüb, undurchsichtig	++	++	++	++	++	−
21	„ „ 442 hell, durchscheinend	++	++	++	++	+	−
	„ „ 442 trüb, undurchsichtig	++	++	++	++	+	−
22	„ „ 506 hell, durchscheinend	++	++	++	++	+	−
	„ „ 506 trüb, undurchsichtig	++	+	±	−	−	−
23	„ „ 468 hell, durchscheinend	++	++	++	++	++	−
	„ „ 468 trüb, undurchsichtig	++	++	++	++	++	−

Nr.	Bezeichnung der Kultur	Serumverdünnung					Kochsalzkontrolle
		1 : 100	1 : 500	1 : 1000	1 : 3000	1 : 5000	
24	Bac. suipestif. 688 hell, durchscheinend	+ +	+ +	+ +	+	±	—
	„ „ 688 trüb, undurchsichtig	+ +	+ +	+	—	—	—
25	„ „ 200 hell, durchscheinend	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	—
	„ „ 200 trüb, undurchsichtig	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	—
26	„ „ 564 hell durchscheinend	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	—
	„ „ 564 trüb, undurchsichtig	+ +	+ +	+	—	—	—
27	„ „ 459 hell, durchscheinend	+ +	+ +	+ +	+	±	—
	„ „ 459 trocken, perlmutterglänzend	+ +	+ +	+ +	+	±	—
28	„ „ Drüe hell, durchschein.	+ +	+ +	+ +	+	±	—
	„ „ „ trocken, perlmutterglänzend	+ +	+ +	+ +	+	—	—
29	Paratyph. Salami hell, durchscheinend	—	—	—	—	—	—
	„ „ trüb, undurchsichtig	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	—
30	„ „ Borchmann, hell, durchscheinend .	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	—
	„ „ „ trüb, undurchsichtig . .	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	—
31	„ Wurst hell, durchscheinend	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	—
	„ „ trüb, undurchsichtig	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	—
32	„ Aertryk groß, aufgefasert .	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	—
	„ „ klein, glattrandig .	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	—
33	„ Kälberruhr groß, aufgefasert	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	—
	„ „ klein, glattrandig	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	—
34	Mäusetyphus I groß, aufgefasert . .	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	—
	„ I klein, glattrandig . .	+ +	+ +	+	—	—	—
35	„ P groß, aufgefasert . . .	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	—
	„ P klein, glattrandig . .	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	—
	„ Löffler groß, aufgefasert .	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	—
36	„ „ klein, glattrandig .	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	—
37	Psittacosis hell, durchscheinend . .	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	—
	„ saftig, perlmutterglänzend .	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	—

Tabelle 24. Agglutination durch Typhus-Eselserum vom Titer 1 : 20000.

Nr.	Bezeichnung der Kultur	Serumverdünnung				Kochsalzkontrolle
		1 : 100	1 : 500	1 : 1000	1 : 5000	
1	Paratyph. Schottmüller groß, aufgefasert . . .	+ +	+ +	+	+	—
	„ „ klein, glattrandig . . .	+ +	+	+	—	—
2	„ Hellwig groß, aufgefasert . . .	+ +	+	+	—	—
	„ „ klein, glattrandig . . .	+ +	+	+	—	—
*3	„ Lange groß, aufgefasert . . .	+	—	—	—	—
	„ „ klein, glattrandig . . .	+ +	+	—	—	—
*4	„ Busse groß, aufgefasert . . .	+	—	—	—	—
	„ „ klein, glattrandig . . .	+	—	—	—	—

Nr.	Bezeichnung der Kultur	Serumverdünnung				Kochsalzkontrolle
		1 : 100	1 : 500	1 : 1000	1 : 5000	
5	Paratyph. England hell, durchscheinend . . .	++	++	+	−	−
	„ „ trüb, undurchsichtig . . .	++	+	±	−	−
*6	„ Storch hell, durchscheinend . . .	+	−	−	−	−
	„ „ trüb, undurchsichtig . . .	−	−	−	−	−
*7	„ Kozuschek hell, durchscheinend . .	±	−	−	−	−
	„ „ trüb, undurchsichtig . .	+	−	−	−	−
8	Bac. suipestifer I groß, aufgefasert	++	++	++	−	−
	„ „ I klein, glattrandig	++	++	+	−	−
9	„ „ 271 groß, aufgefasert	−	−	−	−	−
	„ „ 271 klein, glattrandig	−	−	−	−	−
10	„ „ II hell, durchscheinend . . .	+	+	−	−	−
	„ „ II trüb, undurchsichtig . . .	+	+	−	−	−
11	„ „ III hell, durchscheinend . . .	++	+	+	−	−
	„ „ III trüb, undurchsichtig . . .	+	+	−	−	−
12	„ „ 22 hell, durchscheinend . . .	−	−	−	−	−
	„ „ 22 trüb, undurchsichtig . . .	−	−	−	−	−
13	„ „ Harnstoff, hell, durchscheinend .	−	−	−	−	−
	„ „ „ trüb, undurchsichtig .	+	+	−	−	−
14	„ „ 200 hell, durchscheinend . . .	++	++	+	−	−
	„ „ 200 trüb, undurchsichtig . . .	++	++	±	−	−
15	„ „ 270 hell, durchscheinend . . .	+	+	+	−	−
	„ „ 270 trüb, undurchsichtig . . .	−	−	−	−	−
16	„ „ 442 hell, durchscheinend . . .	−	−	−	−	−
	„ „ 442 trüb, undurchsichtig . . .	±	−	−	−	−
17	„ „ 468 hell, durchscheinend . . .	−	−	−	−	−
	„ „ 468 trüb, undurchsichtig . . .	−	−	−	−	−
18	„ „ 506 hell, durchscheinend . . .	+	−	−	−	−
	„ „ 506 trüb, undurchsichtig . . .	+	−	−	−	−
19	„ „ 688 hell, durchscheinend . . .	±	−	−	−	−
	„ „ 688 trüb, undurchsichtig . . .	±	−	−	−	−
20	„ „ Drüe hell, durchscheinend . . .	−	−	−	−	−
	„ „ „ perlmutterglänzend, trocken .	++	+	−	−	−
21	„ „ 459 hell, durchscheinend . . .	−	−	−	−	−
	„ „ 459 trocken, perlmutterglänzend .	++	−	−	−	−
22	Psittacosis hell, durchscheinend	++	±	−	−	−
	„ feucht, perlmutterglänzend	++	±	−	−	−
23	Paratyph. Salami hell, durcheinend	−	−	−	−	−
	„ „ trüb, undurchsichtig . .	−	−	−	−	−
24	„ Wurst hell, durchscheinend . . .	++	+	±	−	−
	„ „ trüb, undurchsichtig . . .	+	−	−	−	−
25	„ Salami B hell, durchscheinend . .	++	+	±	−	−
	„ „ trüb, undurchsichtig	++	+	+	−	−
26	Mäusetyphus I groß, aufgefasert	++	++	++	−	−
	„ I klein, glattrandig	+	++	+	−	−
27	Kälberruhr groß, aufgefasert	+++	++	+	−	−
	„ klein, glattrandig	++	+	±	−	−

Tabelle 25. Agglutination mit Bac. enterid. Gärtner-Kaninchenserum vom Titer 1 : 10000.

Nr.	Bezeichnung der Kultur	Serumverdünnung				Kochsalzkontrolle
		1 : 100	1 : 500	1 : 1000	1 : 3000	
1	Paratyph. Schottmüller groß, aufgefasert	+	+	−	−	−
	„ „ klein, glattrandig	+	−	−	−	−
2	„ Hellwig groß, aufgefasert	+	−	−	−	−
	„ „ klein, glattrandig	+ +	+	−	−	−
*3	„ Lange groß, aufgefasert	−	−	−	−	−
	„ „ klein, glattrandig	−	−	−	−	−
4	„ Busse groß, aufgefasert	−	−	−	−	−
	„ „ klein, glattrandig	−	−	−	−	−
5	„ England hell, durchscheinend	+	+	−	−	−
	„ „ trüb, undurchsichtig	−	−	−	−	−
*6	„ Storch hell, durchscheinend	−	−	−	−	−
	„ „ trüb, undurchsichtig	−	−	−	−	−
*7	„ Kozuschek hell, durchscheinend	−	−	−	−	−
	„ „ trüb, undurchsichtig	−	−	−	−	−
8	Bac. suipestifer I groß, aufgefasert	−	−	−	−	−
	„ „ I klein, glattrandig	+	+	−	−	−
9	„ „ 271 groß, aufgefasert	−	−	−	−	−
	„ „ 271 klein, glattrandig	−	−	−	−	−
10	„ „ II hell, durchscheinend	−	−	−	−	−
	„ „ II trüb, undurchsichtig	+	−	−	−	−
11	„ „ III hell, durchscheinend	−	−	−	−	−
	„ „ III trüb, undurchsichtig	−	−	−	−	−
12	„ „ 22 hell, durchscheinend	−	−	−	−	−
	„ „ 22 trüb, undurchsichtig	−	−	−	−	−
13	„ „ Harnstoff hell, durchscheinend	−	−	−	−	−
	„ „ „ trüb, undurchsichtig	±	−	−	−	−
14	„ „ 200 hell, durchscheinend	±	−	−	−	−
	„ „ 200 trüb, undurchsichtig	±	−	−	−	−
15	„ „ 270 hell, durchscheinend	+ +	+	−	−	−
	„ „ 270 trüb, undurchsichtig	+	−	−	−	−
16	„ „ 442 hell, durchscheinend	−	−	−	−	−
	„ „ 442 trüb, undurchsichtig	±	−	−	−	−
17	„ „ 468 hell, durchscheinend	−	−	−	−	−
	„ „ 468 trüb, undurchsichtig	−	−	−	−	−
18	„ „ 506 hell, durchscheinend	+	−	−	−	−
	„ „ 506 trüb, undurchsichtig	−	−	−	−	−
19	„ „ 688 hell, durchscheinend	−	−	−	−	−
	„ „ 688 trüb, undurchsichtig	−	−	−	−	−
20	„ „ Drüe hell, durchscheinend	−	−	−	−	−
	„ „ „ trocken, perlmutterglänzend	+ +	+ +	+ +	+	−
21	„ „ 459 hell, durchscheinend	+	−	−	−	−
	„ „ 459 trocken, perlmutterglänzend	+ +	+ +	+ +	+	−
22	Psittacosis hell, durchscheinend	+ +	+ +	+ +	±	−
	„ feucht, perlmutterglänzend	+ +	+ +	+ +	+	−

Nr.	Bezeichnung der Kultur	Serumverdünnung				Kochsalzkontrolle
		1:100	1:500	1:1000	1:3000	
23	Paratyph. Salami hell, durchscheinend . . .	−	−	−	−	−
	„ „ trüb, undurchsichtig	−	−	−	−	−
24	„ Wurst hell, durchscheinend . . .	++	+	−	−	−
	„ „ trüb, undurchsichtig	++	+	−	−	−
25	„ Salami B hell, durchscheinend . .	±	−	−	−	−
	„ „ B trüb, undurchsichtig . . .	+	−	−	−	−
26	Mäusetyphus I groß, aufgefasert	−	−	−	−	−
	„ I klein, glattrandig	−	−	−	−	−
27	Kälberruhr groß, aufgefasert	−	−	−	−	−
	„ klein, glattrandig	−	−	−	−	−

Tabelle 26.

Agglutination mit Voldagsen-Kaninchenserum vom Titer 1:10000.

Nr.	Bezeichnung der Kultur	Serumverdünnung					Kochsalzkontrolle
		1:100	1:500	1:1000	1:5000	1:10000	
1	Paratyph. Schottmüller groß, aufgefasert	+++	++	+	−	−	−
	„ „ klein, glattrandig	+++	++	+	−	−	−
2	„ Hellwig groß, aufgefasert	+++	++	+	−	−	−
	„ „ klein, glattrandig	++	±	−	−	−	−
3	„ Tietz hell, durchscheinend	+++	++	++	±	−	−
	„ „ trüb, undurchsichtig	+++	+++	++	++	−	−
4	Bac. suipestif. 271 groß, aufgefasert	+++	+++	+++	+++	++	−
	„ „ 271 klein, glattrandig	+++	+++	+++	+++	++	−
5	„ „ II hell, durchscheinend	+++	++	+	±	−	−
	„ „ II trüb, undurchsichtig	+++	++	+	−	−	−
6	„ „ III hell, durchscheinend	±	−	−	−	−	−
	„ „ III trüb, undurchsichtig	++	+	+	−	−	−
7	„ „ 270 hell, durchscheinend	+++	+++	+++	++	+	−
	„ „ 270 trüb, undurchsichtig	++	+	+	−	−	−
8	„ „ 688 hell, durchscheinend	+++	+++	+++	+++	++	−
	„ „ 688 trüb, undurchsichtig	+++	+++	++	+	+	−
9	„ „ 506 hell, durchscheinend	+++	+++	+++	+++	++	−
	„ „ 506 trüb, undurchsichtig	+++	+++	+++	+	+	−
10	„ „ Drüe hell, durchscheinend	+++	+++	+++	+++	++	−
	„ „ „ trocken, perlmutterglänz.	+++	+++	++	−	−	−
11	„ „ 459 hell, durchscheinend .	+++	+++	+++	+++	++	−
	„ „ 459 trocken, perlmutterglänz.	+++	+++	+++	+++	++	−
12	Paratyph. Salami hell, durchscheinend	+++	+++	++	−	−	−
	„ „ trüb, undurchsichtig	++	+	±	−	−	−
13	„ „ B hell, durchscheinend	+++	+++	+++	++	+	−
	„ „ B trüb, undurchsichtig	+++	++	++	+	−	−
14	Mäusetyphus I groß, aufgefasert . . .	−	−	−	−	−	−
	„ I klein, glattrandig . .	−	−	−	−	−	−

agglutiniert werden. Auch bei den Kulturen der zweiten Mutationsgruppe finden wir bei den verschiedenartigen, hierher gehörigen Stämmen ähnliche Agglutinationsdifferenzen. So wurden z. B. die Bakterien der hellen, durchscheinenden Kolonien bei Paratyphus Tietz, Bac. suipestif. 270, 506, 688 u. 564 in größeren Verdünnungen von dem Paratyphusserum agglutiniert als die trüben, undurchsichtigen Kolonien der gleichen Stämme. Aber auch hier liegt kein für alle Stämme konstantes Verhalten vor. Denn die Bazillen der letztgenannten Varietät zeigen bei anderen Kulturen, z. B. bei Bac. suipestif. 2, eine höhere agglutinatorische Beeinflussung, während die Mehrzahl der in Betracht kommenden Stämme für beide Mutationsformen den gleichen Ausfall der Agglutination aufweist. Besonders hinweisen möchte ich noch auf das agglutinatorische Verhalten von Paratyphus Salami hell, der sich trotz der hohen Serumkonzentration von 1 : 100 auch bei wiederholter Prüfung als inagglutinabel erwies, während die andere Mutationsform von Paratyphus Salami bis zur Titergrenze vom Serum kräftig agglutiniert wird. Bei den Kulturen der Hogcholeragruppe, soweit sie im Mutationsbild an die Kolonieformen der Bac. enterid. Gaertner-Bakterien erinnern, also bei dem Psittacosisstamm, bei Bac. suipestif. Drüe und Bac. suipestif. 459 finden wir zwischen den Individuen der hellen, durchscheinenden und der trüben, perlmutterartig glänzenden Kolonien in agglutinatorischer Hinsicht keine nennenswerten Unterschiede. Diese gleichartige agglutinatorische Beeinflussung der beiden Mutationsformen bei den Stämmen der Hogcholeragruppe, welche ähnlich wie die Gaertnerkulturen mutieren, ist deshalb beachtenswert, weil, worauf ich noch zurückkomme, die mutierten Kolonieformen bei Bac. enterid. Gaertner in dieser Hinsicht ein ganz anderes agglutinatorisches Verhalten zeigen.

Während also die Untersuchung mittels des Paratyphus B-Kaninchenserums zu keinem bestimmten Ergebnis nach der einen oder anderen Richtung geführt hat, sehen wir aus dem in Tabelle 24 zusammengefaßten Ergebnis, daß eine bemerkenswerte Mitagglutination durch das Typhus-Immunserum sich bei der Mehrzahl der zur 1. Mutationsgruppe gehörigen, verschiedenartigen Stämme beobachten läßt, die in ihren Varietäten den Kolonieformen bei Typhus Gläwe gleichen. So werden die Kulturen Paratyphus Hellwig, Bac. suipestifer I, Mäusetyphus I, Kälberruhr durch das Typhusserum noch bei einer Verdünnung von 1 : 1000 kräftig agglutiniert, und zwar in ihren beiden Varietäten, Paratyphus Schottmüller in seiner großen, aufgefaserten Kolonieform sogar noch bei 1 : 5000. Weniger hoch beeinflußt werden die mit * bezeichneten, frisch isolierten Stämme Paratyphus Lange und Paratyphus Busse, während Bac. suipestifer 271 als einzige Kultur dem genannten Serum gegenüber sich als refraktär erweist. Bei den Kulturen, die den zweiten Mutationstyp der Paratyphusgruppe repräsentieren, findet sich nur bei einem wesentlich kleineren Bruchteil derselben eine nennenswerte Einwirkung des erwähnten Serums, so z. B. bei Paratyphus England, Bac. suipestifer III, Bac. suipestifer 200, Paratyphus Wurst, Paratyphus Salami B, wobei die Agglutination kaum die Höhe der Verdünnung 1 : 1000 erreicht. Es machen sich ferner gewisse Schwankungen geltend in der Art, daß bald die helle, bald die trübe, undurchsichtige Kolonienart die höhere Agglutinabilität aufweist. Die Kulturen Paratyphus Storch, Paratyphus Kozuschek, Bac. suipestif. 22, 442, 688,

468, 506, Paratyphus Salami dagegen werden durch das Typhusserum entweder überhaupt nicht oder nur bei starker Serumkonzentration mitagglutiniert. Zusammengefaßt sehen wir also deutliche Unterschiede inbezug auf die Agglutinabilität zwischen den Mutationsgruppen 1 und 2, insofern als bei der Mehrzahl der zur Gruppe 1 gehörigen Stämme eine ziemlich weitgehende Beeinflussung durch das Typhus-Immunserum statthat und zwar bei beiden Mutationsformen ziemlich gleichmäßig. Bei der zweiten Mutationsgruppe der Hogcholerastämme ist es dagegen nur eine kleine Anzahl von Kulturen, die mitagglutiniert werden. Aber auch diese Stämme lassen nur eine geringe Einwirkung des Typhusserums erkennen, der größere Teil der Kulturen wird überhaupt nicht oder nur ganz schwach agglutiniert. Wie bei diesen letztgenannten Stämmen liegen auch, die agglutinatorischen Verhältnisse bei den drei, im Mutationsbild den Gaertnerbakterien nahestehenden Stämmen Bac. suipestif. Drüe, Bac. suipestif. 459 und Psittacosis, indem die beiden erstgenannten Kulturen in der hellen Kolonienart überhaupt nicht, in der trüberen, perlmutterartig glänzenden ebenso wie die beiden Varietäten von Psittacosis nur bei der starken Konzentration des Serums von 1 : 500 in bezug auf die Agglutinationsprüfung eine positive Reaktion geben.

Noch deutlicher sind die Unterschiede in bezug auf das agglutinatorische Verhalten je nach dem Mutationstyp bei den Hogcholerakulturen gegenüber dem Bac. enterid. Gaertner-Serum. Aus der Tabelle 25 ergibt sich namentlich, daß die Varietäten der dem ersten Mutationstyp angehörenden Kulturen, die eine bemerkenswerte Mitagglution durch das Typhusimmunserum aufgewiesen haben, ebenso wie die Kolonieformen der zweiten Mutationsgruppe von Hogcholerastämmen zum weitaus größten Teil durch das Bac. enterid. Gaertner-Kaninchenserum überhaupt nicht, einzelne z. B. Paratyph. Schottmüller, Paratyph. Hellwig, Bac. suipestifer 270, Paratyph. Wurst nur bei beträchtlicher Serumkonzentration agglutiniert werden. Dagegen beobachtet man, daß die drei Stämme, welche in bezug auf ihre Mutationserscheinungen mit den Bac. enterid. Gaertner-Kulturen eine gewisse Verwandtschaft besitzen und durch das Typhus-Eselserum nur wenig beeinflußt wurden, vom Gaertner-Kaninchenserum noch bei der hohen Verdünnung von 1 : 3000 und zwar Bac. suipestif. Drüe und Bac. suipestif. 459 nur bei der perlmutterartig glänzenden Varietät, Psittacosis sogar in seinen beiden Kolonieformen kräftig agglutiniert werden.

Was endlich die Agglutinationsprüfung durch das Voldagsen-Kaninchenserum betrifft, so ergab sich hier, daß ein Parallelgehen der Mutation mit dem agglutinatorischen Verhalten bei den Hogcholerastämmen nicht auftrat. Wie aus Tabelle 26 ersichtlich ist, finden sich zwar auch in Übereinstimmung mit den Angaben von Haendel, Gildemeister und Teodorascu (12), daß die einzelnen Stämme der Hogcholeragruppe vom Voldagse-Serum verschieden hoch agglutiniert werden und nach dem agglutinatorischen Verhalten zwei Gruppen bilden, von denen die eine von dem Serum stark, die andere überhaupt nicht oder nur ganz schwach beeinflußt wird. Daneben finden sich einzelne Kulturen, die in ihrem agglutinatorischen Verhalten einen Übergang zwischen diesen beiden Gruppen darstellen. Dagegen ist die Verschiedenheit der Agglutinabilität für das Voldagsen-Serum ganz unabhängig von der

Art und Weise wie die Stämme mutieren. So finden wir ganz beträchtliche Schwankungen in der Agglutination unter den Kulturen des ersten Mutationstyps: während z. B. Bac. suipestif. 271 prompt bis zur Titergrenze agglutiniert wird, sehen wir bei Paratyph. Schottmüller nur noch bei einer Verdünnung von 1 : 1000, bei Mäusetyphus I dagegen nicht einmal bei der Konzentration von 1 : 100 eine Einwirkung des Serums. Die Agglutinationsdifferenzen zwischen den verschiedenen Kulturen sind hier beträchtlicher als zwischen ihren einzelnen Varietäten. Auch bei den Kulturen der zweiten Mutationsgruppe sind die Verhältnisse im allgemeinen derart gelagert. So zeigen z. B. Bac. suipestif. 688 und 506 eine kräftige Agglutination bis zu der Titergrenze des Serums, während andere Stämme, darunter Bac. suipestif. II, Paratyph. Salami, erst bei 10fach stärkerer Konzentration, Bac. suipestif. III hell kaum bei Verdünnung 1 : 100 eine Beeinflussung durch das Serum erkennen lassen. Der Unterschied in der Agglutinabilität der einzelnen Varietäten macht sich auch hier nicht zugunsten einer bestimmten Kolonieform geltend und bewegt sich in weiten Grenzen. Bac. suipestif. III hell z. B. wird nur schwach bei Verdünnung 1 : 100, die trübe Kolonieform des gleichen Stammes dagegen gut bei 1 : 1000 agglutiniert, umgekehrt wird bei Bac. suipestif. 270 die helle Varietät bei Verdünnung 1 : 10000, die trübe Kolonienart aber nur bei der Konzentration 1 : 1000 vom Serum beeinflußt. Die Bakterien beider Kolonieformen der wenigen Stämme, die in einer dem Bac. enterid. Gaertn. nahestehenden Weise Mutationserscheinungen zeigen, werden sämtlich, abgesehen von der perlmutterartig glänzenden Kolonienart Bac. suipestif. Drüe vom Voldagsen-Serum bis zur Titergrenze agglutiniert.

V. Bac. enterid. Gaertner.

Im vorausgehenden Abschnitt hatte ich bereits erwähnt, daß einige Stämme der Hogcholeragruppe ähnlich wie die Gaertnerstämme mutieren, indem sie auf der Agarplatte helle, durchscheinende und trübe, perlmutterartig glänzende Kolonien entwickeln. In der Tat zeigte es sich, daß die Bac. enterid. Gaertner-Kulturen beim Auftreten der Mutationserscheinungen nach meinen bisherigen Untersuchungen alle einheitlich nur zwei Kolonienarten bilden, gleichgültig, ob die Stämme aus dem Menschen oder aus dem Tier oder aus Nahrungsmitteln gezüchtet worden waren: einmal helle, durchscheinende Kolonien und daneben, in der Regel weniger zahlreich, perlmutterartig glänzende, schwach gelblich-weiße Scheibchen, wie sie in Figur 3 der Tafel VII wiedergegeben sind. Wie aus den Abbildungen 1 und 2 der Tafel X hervorgeht, werden ähnlich wie bei den Hogcholerastämmen der dritten Mutationsgruppe die hellen Kolonien von sehr kurzen, dicken, plumpen Stäbchen gebildet, während die perlmutterartig glänzenden, irisierenden Kolonien aus sehr langen, mäßig dicken zu Fadenbildung neigenden Bazillen bestehen. Bei der Besprechung der in gleicher Weise mutierenden Hogcholerakulturen wurde bereits hervorgehoben, daß die letztgenannten Kolonien sehr labiler Natur sind, und bei ihnen bereits innerhalb 24 Stunden Mutationserscheinungen einsetzen. Um bei den Untersuchungen eine genügende Zahl von irisierenden Kolonien zu erhalten und außerdem eine Beimengung von hellen, durch-

scheinenden Kolonien zu vermeiden, muß man also ausschließlich junge Kolonien von der Agarplatte statt Schrägagarkulturen verwenden.

Die Prüfung der einzelnen Mutationsformen verschiedener Gaertnerkulturen auf anderen, festen Nährböden wie z. B. auf dem Drigalskischen Lackmus-Laktose-Agar ergab im Aussehen der einzelnen Kolonien keine nennenswerte Unterschiede, dagegen blieben die morphologischen Differenzen zwischen den einzelnen Bakterien, aus denen sich jeweils die beiden Kolonieformen der mutierten Stämme zusammensetzen, ebenfalls wieder deutlich erhalten und bei der Rückimpfung auf die Agarplatte traten, wie dies ja auch bei den bisher beschriebenen Bakterienarten der Fall ist, auch die auffallenden Unterschiede zwischen den beiden Kolonienarten wieder deutlich zutage. Auch auf den übrigen Differentialnährböden lassen sich, wie dies aus der zusammenfassenden Darstellung in Tabelle 27 ersichtlich ist, besondere Unterschiede im kulturellen Verhalten zwischen den beiden Mutationsformen eines und desselben Stammes nicht nachweisen.

Höchst eigenartig liegen dagegen die Agglutinationsverhältnisse bei den isolierten Varietäten der Gaertnerbakterien. Ich benutzte zur Prüfung des agglutinatorischen Verhaltens der beiden Mutationsformen zwei besondere Kaninchensera, von denen ich das eine mit der hellen Varietät, das andere mittels der trüben, perlmutterartig glänzenden Kolonienart eines Gaertnerstammes hergestellt hatte. Bei der Untersuchung der Agglutinabilität mittels des Gaertner-Kaninchenserums der hellen Art zeigte sich, wie dies in Tabelle 28 zum Ausdruck gebracht ist, eine weitgehende, spezifische Beeinflussung für die Bakterien der entsprechenden Mutationsform. Es werden die Bakterien der hellen Kolonienart noch in sehr starken Verdünnungen von dem homologen Serum gut agglutiniert, während die Individuen der perlmutterglänzenden Kolonien meist nicht einmal bei der hohen Konzentration 1 : 100 wie z. B. bei Bac. enter. Gaertn. K. G. A., Gaertn. Wurmser und Bac. Moorseele vom Serum beeinflußt wurden. Nur in einem Falle bei Bac. Gaertn. Fleischvergift. 21 ließ sich noch bei einer Verdünnung von 1 : 1000, also bei einer 10fach stärkeren Konzentration des Serums, wie seiner Titergrenze entspricht, eine deutliche agglutinatorische Einwirkung des Serums erkennen. Bei diesem Stamm handelt es sich aber offenbar um eine überhaupt gut agglutinable Kultur; denn auch die zugehörige helle Varietät weist unter den geprüften Stämmen die stärkste agglutinatorische Beeinflussung durch das erwähnte Serum auf, nämlich starke Agglutination bei Verdünnung 1 : 20000, noch deutliche Beeinflussung bei 1 : 40000. Sie übersteigt also den dem Serum den übrigen Kulturen, auch dem zur Herstellung des Serums dienenden Gaertnerstamm gegenüber zukommenden Agglutinationstiter so erheblich, daß der Unterschied in der Beeinflussung der beiden Mutationsformen der Gaertnerkultur 21 (Fleischvergiftung) doch ebenso groß ist, wie die Agglutationsdifferenzen bei den Varietäten der anderen untersuchten Gärtnerstämme. Bei der Agglutinationsprüfung der Gaertnerkulturen durch ein Kaninchen-Immunserum der perlmutterartig glänzenden Mutationsart vom gleichen Stamm zeigte sich die auffallende Erscheinung, daß auch durch dieses gewissermaßen heterologe Serum jeweils die hellen Mutationsformen der einzelnen Kulturen durchweg noch höher agglutiniert wurden, als die zugehörigen, trüben Kolonieformen. Wie die Zusammen-

Tabelle

Nummer	Bezeichnung der Kultur	Löffler I	Löffler II	Barsiekow I	Barsiekow II
1	Bac. enter. Gaertner hell, durchscheinend	schaumige Gerinnung	geringe Trübung, Aufhellung	Rötung, Gerinnung	unverändert
	Bac. enter. Gaertner trüb, perlmutterartig glänzend	„	„	„	„
2	Gaertner Däschler hell, durchscheinend	schaumige Gerinnung	geringe Trübung, Aufhellung	Rötung, Gerinnung	unverändert
	Gaertner Däschler perlmutterglänzend	„	„	„	„
3	Gaertner Wurmser hell, durchscheinend	schaumige Gerinnung	geringe Trübung, Aufhellung	Rötung, Gerinnung	unverändert
	Gaertner Wurmser perlmutterglänzend	„	„	„	„
4	Fleischvergiftung Nr. 21 hell, durchscheinend	schaumige Gerinnung	Trübung, starke Aufhellung	Rötung, Gerinnung	unverändert
	Fleischvergiftung Nr. 21 perlmutterglänzend	„	„	„	„
5	Gaertner (Schwein) 603 hell, durchscheinend	schaumige Gerinnung	geringe Trübung, Aufhellung	Rötung, Gerinnung	unverändert
	Gaertner (Schwein) 603 perlmutterglänzend	„	„	„	„
6	Gaertner (Schwein) 659 hell durchscheinend	schaumige Gerinnung	geringe Trübung, Aufhellung	Rötung, Gerinnung	unverändert
	Gaertner (Schwein) 659 perlmutterglänzend	„	„	„	„
7	Gaertner (Schwein) 714 hell, durchscheinend	schaumige Gerinnung	mäßige Trübung, Aufhellung	Rötung, Gerinnung	unverändert
	Gaertner (Schwein) 714 perlmutterglänzend	„	„	„	geringe Rötung
8	Gaertner (Schwein) 586 hell, durchscheinend	schaumige Gerinnung	Trübung und Aufhellung	Rötung, Gerinnung	unverändert
	Gaertner (Schwein) 586 perlmutterglänzend	„	„	„	„
9	Bac. Moorseele hell durchscheinend	starke schaumige Gerinnung	Trübung und geringe Aufhellung	Rötung, Gerinnung	unverändert
	Bac. Moorseele perlmutterglänzend	„	„	„	„

27.

Lackmus-molke	Hetsch	Milch	Trauben-zucker-	Milch-zucker	Neutral-rotagar	Orceïnagar
			Bouillon			
Tiefblau-färbung	Rötung, Gerinnung, Gasbildung	Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung, starke Gasbildung, Fluoreszenz	geringe Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Blaufärbung	Rötung, Gerinnung, Gasbildung	Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung, Gasbildung, Fluoreszenz	geringe Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Blaufärbung	Rötung, Gerinnung, Gasbildung	Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	geringe Entfärbung, Gasbildung	—
„	„	„	„	„	„	—
Blaufärbung	Rötung, Gerinnung, Gasbildung	starke Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung, Gasbildung. Fluoreszenz	Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Blaufärbung	Rötung, Gerinnung, Gasbildung	Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung, Gasbildung, Fluoreszenz	geringe Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Tiefblau-färbung	Rötung, Gerinnung, Gasbildung	Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung, Gasbildung, Fluoreszenz	geringe Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Blaufärbung	Rötung, Gerinnung, Gasbildung	Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung, Gasbildung, Fluoreszenz	Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Tiefblau-färbung	Rötung, Gerinnung, Gasbildung	starke Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	Entfärbung, Gasbildung, Fluoreszenz	geringe Aufhellung
Blaufärbung	„	„	„	„	„	„
Blaufärbung	Rötung, Gerinnung, Gasbildung,	starke Aufhellung und Alkalisierung	Gasbildung	unverändert	geringe Entfärbung, Gasbildung, Fluoreszenz	Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„

Tabelle 28. Agglutination mit Gaertner-Kaninchenserum der hellen Varietät. Titer 1 : 10000.

Nr.	Bezeichnung der Kultur	Serumverdünnung						Kochsalzkontrolle
		1 : 100	1 : 500	1 : 1000	1 : 5000	1 : 10 000	1 : 20 000	
1	Gaertn. K. G. A. hell	++	++	++	++	++	+	−
	„ „ perlmutterglänzend	−	−	−	−	−	−	−
2	„ Däschler hell	++	++	++	++	+	−	−
	„ „ perlmutterglänzend	++	±	−	−	−	−	−
3	„ Wurmser hell	++	++	++	+	+	±	−
	„ „ perlmutterglänzend	±	−	−	−	−	−	−
4	Fleischvergift. Nr. 21 hell	++	++	++	++	++	++	−
	„ Nr. 21 perlmutterglänz.	++	++	+	±	−	−	−
5	Gaertn. (Schwein) 586 hell	++	++	++	++	++	+	−
	„ „ 586 perlmutterglänz.	+	−	−	−	−	−	−
6	„ „ 603 hell	++	++	++	++	++	+	−
	„ „ 603 perlmutterglänz.	++	±	−	−	−	−	−
7	„ „ 659 hell	++	++	++	++	+	±	−
	„ „ 659 perlmutterglänz.	+	+	−	−	−	−	−
8	„ „ 714 hell	++	++	++	+	−	−	−
	„ „ 714 perlmutterglänz.	+	−	−	−	−	−	−
9	Bac. Moorseele hell	++	++	++	++	+	−	−
	„ „ perlmutterglänzend	−	−	−	−	−	−	−

Tabelle 29. Agglutination mit Gaertner-Kaninchenserum der trüben Varietät. Titer 1 : 10 000.

Nr.	Bezeichnung der Kultur	Serumverdünnung						Kochsalzkontrolle
		1 : 100	1 : 500	1 : 1000	1 : 5000	1 : 10000	1 : 20000	
1	Gaertner hell	++	++	++	++	++	+	−
	„ perlmutterglänzend	++	++	+	−	−	−	−
2	„ Däschler hell	++	++	++	+	+	−	−
	„ „ perlmutterglänzend	++	++	+	−	−	−	−
3	„ Wurmser hell	++	++	++	++	+	±	−
	„ „ perlmutterglänzend	++	++	+	−	−	−	−
4	Fleischvergift. Nr. 21 hell	++	++	++	++	++	++	−
	„ Nr. 21 perlmutterglänz.	++	+	+	−	−	−	−
5	Gaertn. (Schwein) 586 hell	++	++	++	+	+	−	−
	„ „ 586 perlmutterglänz.	++	+	+	−	−	−	−
6	„ „ 603 hell	++	++	++	++	+	−	−
	„ „ 603 perlmutterglänz.	++	+	+	−	−	−	−
7	„ „ 659 hell	++	++	++	+	+	±	−
	„ „ 659 perlmutterglänz.	++	++	+	−	−	−	−
8	„ „ 714 hell	++	++	+	+	±	−	−
	„ „ 714 perlmutterglänz.	++	+	±	−	−	−	−
9	Bac. Moorseele hell	++	++	++	++	++	+	−
	„ „ perlmutterglänzend	+	+	−	−	−	−	−

fassung des Resultates in Tabelle 29 ergibt, werden die hellen Mutationsformen der Kulturen noch durch eine 10—20fach höhere Verdünnung des Serums der trüben Varietät agglutinatorisch beeinflußt wie die Bakterien der trüben Kolonieform. Es ließ sich also hier keine spezifische Serumeinwirkung gegenüber der perlmutterartig glänzenden Mutationsvarietät nachweisen, wie dies in so ausgesprochenem Maße bei den hellen Mutationsformen gegenüber dem zugehörigen Serum stattfand, sondern auch in diesem Falle wurden die Bakterien der hellen Art durch das Serum des trüben Mutationsstammes höher agglutiniert. Die schlechtere Agglutinabilität der trüben, permutterglänzenden Kolonieformen trat bei sämtlichen, mir zur Verfügung stehenden gewöhnlichen Gaertnerseris ebenfalls in der gleichen Weise in Erscheinung.

Bei diesem auffallend verschiedenen Verhalten der beiden Mutationsformen in agglutinatorischer Hinsicht schien es mir von Interesse, einige vergleichende Versuche über die agglutininbindenden Fähigkeiten der beiden Mutationsstämme gegenüber solchen Seris anzustellen, die entweder mit der einen oder mit der anderen Varietät gewonnen worden waren.

Die Versuche wurden in der Weise ausgeführt, daß jeweils 5 ccm einer Serumverdünnung von 1 : 50 mit je 16 Ösen Kulturmasse gemengt und zwei Stunden lang im Brutschrank bei 37 ° gehalten wurden. Nach Abzentrifugieren der Bakterien wurden die abgebundenen Sera gegenüber den beiden Mutationsstämmen agglutinatorisch ausgewertet. Als Kontrolle wurde die gleiche Verdünnung 1 : 50 der Sera herangezogen, die ebenfalls zwei Stunden im Brutschrank bei 37 °, aber ohne Zusatz von Bakterien gestanden hatte. Das Ergebnis der Agglutinationsprüfung mit den abgebundenen Seris ist in Tabelle 30 übersichtlich zusammengestellt. Wir ersehen daraus, daß bei der Abbindung des mit dem hellen Mutationsstamm hergestellten Serums durch die

Tabelle 30.

Nummer	Bezeichnung der Kultur	Serumverdünnung						Kochsalzkontrolle	Art des verwendeten Serums
		1 : 50	1 : 100	1 : 500	1 : 1000	1 : 5000	1 : 10 000		
1	Gaertn. Moorseele hell	+++	+++	+++	++	++	±	−	Serum hell, abgebunden durch G. Moorseele trüb
2	„ „ „	+++	+++	+++	++	++	+	−	Serum hell (Kontrolle)
1	Gaertn. Moorseele hell	+++	+++	++	+++	++	+	−	Serum trüb, abgebunden durch G. Moorseele hell
	„ „ trüb	++	+	−	−	−	−	−	
2	„ „ hell	+++	+++	+++	+++	++	++	−	Serum trüb, abgebunden durch G. Moorseele trüb
	„ „ trüb	−	−	−	−	−	−	−	
3	„ „ hell	+++	+++	+++	+++	++	++	−	Serum trüb (Kontrolle)
	„ „ trüb	++	+	+	−	−	−	−	

Bakterien der perlmutterartig glänzenden, trüberen Kolonienart das Agglutinationsvermögen dieses Serums gegenüber dem entsprechenden hellen Mutationsstamm nicht in nennenswerter Weise beeinflußt wird. Auf eine agglutinatorische Auswertung des abgebundenen Serums für die Bakterien der trüberen Kolonieform verzichtete ich, da diese von dem unveränderten hellen Serum an und für sich nicht einmal bei der Konzentration von 1 : 50 agglutiniert werden. Bei dem mit dem trübe Kolonien bildenden Mutationsstamm hergestellten Serum ergab der Versuch, daß durch die Abbindung mittels der Bakterien der hellwachsenden Art weder für den hellen noch für den trüben Mutationsstamm eine bemerkenswerte Absorption von Agglutininen stattfand. Dagegen beobachtet man nach Abbindung des genannten Serums durch die entsprechenden Bakterien der trüberen Kolonien eine spezifische Beeinflussung des Agglutinationsvermögens in der Art, daß die trübe wachsenden Bakterien von dem mit ihnen abgebundenen, homologen Serum vom Titer 1 : 100 nicht mehr bei der Konzentration von 1 : 50 agglutiniert werden, während die agglutinatorischen Fähigkeiten dieses Serums gegenüber der heterologen, hellwachsenden Bakterienart vollständig erhalten bleiben. Aus diesem auffallenden Untersuchungsergebnis sollen hier zunächst keine weiteren Schlüsse gezogen werden, da Versuche nach dieser Richtung, auch bezüglich der sich ähnlich verhaltenden Ruhr- und Bact. coli-Stämme noch weiter angestellt werden, und über das Ergebnis derselben besonderer Bericht erfolgen wird.

VI. Ruhr.

a) Shiga-Kruse-Ruhr.

Ähnlich wie bei Typhus und Paratyphus ließen sich auch bei den zur Untersuchung herangezogenen Shiga-Kruse Ruhrstämmen mehrere scharf ausgeprägte Mutationsgruppen unterscheiden. Bei den Kulturen Ruhr Shiga I, Ruhr Grünwald, Ruhr Jürgens entwickelten sich ähnlich wie bei den zur zweiten Mutationsgruppe bei Typhus gehörigen Stämmen nach Aussaat aus mindestens drei Wochen alten Agarröhrchen auf der Agarplatte neben hellen, durchscheinenden, bröckeligen Kolonien auch gelbweiße, undurchsichtige, glattrandige Scheiben, wie dies aus der Abbildung 4 der Tafel VII ersichtlich ist. Die morphologischen Differenzen zwischen den Bakterien der verschiedenen Kolonien sind bei der Shiga-Kruse-Ruhr ebenfalls deutlich ausgeprägt und recht beträchtlich. Den hellen, bröckeligen Kolonien entsprechen lange, ziemlich schlanke, zu Fadenbildung neigende Stäbchen. Die glattrandigen, trüben, gelbweißlichen Scheibchen aber setzen sich aus kurzen, plumpen, dicken Bakterien zusammen. Diese Unterschiede zwischen den Bakterien der differenten Kolonien sind in den Abbildungen 3 und 4 der Tafel X beispielsweise wiedergegeben. Bei anderen Stämmen z. B. Ruhr Ditthorn bietet sich wieder ein anderes Mutationsbild. So wuchsen nach dem Ausstrich auf der Agarplatte neben hellen, glattrandigen, zarten Scheibchen gelbweiße, undurchsichtige, ebenfalls glattrandige Kolonien. Wir finden bei dieser Kultur also Mutationserscheinungen, deren Kolonieformen mit denen bei Cholera und bei der ersten Mutationsgruppe des Typhus große Ähnlichkeit aufweisen. Die morphologischen Differenzen zwischen den Bakterien der differenten Kolonien

äußern sich hier in der Weise, daß die hellen, durchscheinenden Kolonien von ziemlich langen, schlanken Stäbchen gebildet werden, die aber nicht die Neigung haben, zu langen Fäden auszuwachsen, während die trüben, gelbweißen sich aus sehr kurzen, dicken, plumpen Bazillen zusammensetzen, wie die Abbildungen 5 und 6 der Tafel X zeigen.

Wie bei Cholera sind bei der Shiga-Kruse-Ruhr die Mutationserscheinungen im allgemeinen nach Impfung aus 3—4 Wochen alten Agarröhrchen nachweisbar. Die einzelnen isolierten Arten derselben Kultur lassen sich bei regelmäßiger Weiterimpfung ebenfalls konstant fortzüchten, und erst nach 3—4 Wochen langem Stehen der Agarröhrchen kann man erneut Mutationserscheinungen bei der Aussaat beobachten, also erst nach einer Zeit, die meist die äußerste Grenze darstellt, in der eine Weiterimpfung der auf künstlichen Nährböden nicht sehr resistenten Ruhrbakterien gerade noch gelingt.

Im Gegensatz zu Cholera und in Übereinstimmung mit den bei Typhus und Paratyphus gefundenen Verhältnissen mutieren die Shiga-Kruse-Ruhrstämme nicht ständig in der gleichen Weise. So konnte ich z. B. bei Ruhr Shiga I, die früher unter dem ersten Mutationsbild mutierte, also auf der Agarplatte einmal helle, bröckelige, durchscheinende Kolonien und daneben trübe, gelbweiße, glattrandige gebildet hatte, beobachten, daß sie nach Jahresfrist plötzlich beim Einsetzen der Mutationserscheinungen in Form von hellen, glattrandigen und trüben, gelbweißen, ebenfalls glattrandigen Scheibchen wuchs, also wie der zweite, bisher beobachtete Mutationstyp der Shiga-Kruse-Ruhrbakterien. Zugleich waren auch die morphologischen Differenzen der Bakterien diesen Kolonieformen angepaßt; wir finden also statt der langen, schlanken, Faden bildenden Stäbchen der hellen, bröckeligen, geriffelten Kolonien bei der hellen Varietät hier nur einfache, lange, schlanke Stäbchen ohne Neigung zu Fadenbildung.

Bei Überimpfung auf andere feste Nährböden (Drigalskis Lackmus-Laktose-Agarplatten) bleiben wie beim Typhus die verschiedenartigen Kolonieformen der mutierten Ruhrstämme ebenso wie die morphologischen Unterschiede der Bakterien in voller Deutlichkeit, ganz besonders ausgesprochen bei dem ersten Mutationstyp, erhalten. So sehen wir z. B. auf der Blauplatte die hellen, bröckeligen Kolonien der Agarplatte als feine, tiefblaue, bröckelige Scheibchen sich entwickeln, während die gelbweißen, glattrandigen Formen auf dem Drigalskischen Nährboden als trübe, saftigere, weißblaue Kolonien erscheinen. Dieses Aussehen zeigen auch die gelbweißen Kolonien der zweiten Mutationsgruppe, die hellen, glattrandigen Kolonien der Agarplatte dagegen heben sich auf dem Lackmus-Laktose-Agar als feine, durchscheinende, dunkelblaue Scheibchen von der Oberfläche ab.

Auch bei den Ruhrbakterien prüfte ich das kulturelle Verhalten der isolierten Varietäten in den verschiedenen, für die Differentialdiagnose der Typhus-Coligruppe verwendeten Nährmedien. Das Ergebnis, welches in Tabelle 31 übersichtlich dargestellt ist, läßt erkennen, daß zwischen den einzelnen Kolonieformen im Ausfall der Reaktionen nicht nur kein prinzipieller Unterschied besteht, sondern daß auch die graduellen Differenzen, wie wir sie gelegentlich bei Typhus, Paratyphus usw. an

einzelnen Nährböden beobachten konnten, hier fast gar nicht zum Ausdruck kommen. Vielleicht mag der Umstand, daß gerade die Shiga-Kruse Ruhrbakterien in einzelnen dieser Differentialnährböden sich verhältnismäßig recht langsam entwickeln, bei dem ziemlich gleichmäßigen Ausfall der Wachstumserscheinungen eine gewisse Rolle gespielt haben.

Tabelle 31.

Nummer	Bezeichnung der Kultur	Löffler I	Löffler II	Lackmusmolke	Milch	Barsiekow I	Barsiekow II	Hetsch	Traubenzucker-Bouillon	Milchzucker-Bouillon	Neutralrotagar
1	Ruhr Shiga I hell, bröckelig	—	—	geringe Rötung	—	geringe Rötung	—	Rötung im unteren Teil d. Röhrchens	—	—	—
	Ruhr Shiga I gelbweiß, glattrandig	—	—	„	—	„	—	„	—	—	—
2	Ruhr Grünwald hell, bröckelig	—	—	Rötung	—	Rötung	—	Rötung im unteren Teil d. Röhrchens	—	—	—
	Ruhr Grünwald gelbweiß, glattrandig	—	—	„	—	„	—	„	—	—	—
3	Ruhr Jürgens hell, bröckelig	—	—	geringe Rötung	—	geringe Rötung	—	Rötung im unteren Teil d. Röhrchens	—	—	—
	Ruhr Jürgens gelbweiß, glattrandig	—	—	„	—	„	—	„	—	—	—
4	Ruhr Ditthorn hell, glattrandig	—	—	Rötung	—	Rötung	—	Rötung im unteren Teil d. Röhrchens	—	—	—
	Ruhr Ditthorn gelb, glattrandig	—	—	„	—	„	—	„	—	—	—
5	Ruhr Förster hell, glattrandig	—	—	Rötung	—	Rötung	—	—	—	—	—
	Ruhr Förster gelbweiß, glattrandig	—	—	„	—	„	—	—	—	—	—

Die Agglutinabilität wurde gleichzeitig bei den beiden Mutationsgruppen zugleich mittels eines durch Ruhr Shiga I gewonnenen Kaninchen-Immunserums vom Titer 1 : 1000 geprüft, um etwaige Differenzen zwischen den isolierten Mutationsstämmen einer Kultur, sowie eventuelle Unterschiede zwischen den verschiedenen Mutationstypen feststellen zu können. Wie aus dem in Tabelle 32 niedergelegten Resultat zu entnehmen ist, werden sowohl die einzelnen untersuchten Stämme wie die verschiedenen Mutationsformen ziemlich gleichmäßig agglutiniert. Ein auffallender Unterschied macht sich jedenfalls weder in der einen, noch in der anderen Richtung geltend.

Tabelle 32. Agglutination mit einem Shiga-Kruse Ruhr-Kaninchenserum vom Titer 1 : 1000.

Nummer	Bezeichnung der Kultur	Serumverdünnung				Kochsalzkontrolle
		1 : 100	1 : 500	1 : 800	1 : 1000	
1	Ruhr Shiga I hell, bröckelig	++	++	+	+	−
	„ „ gelbweiß, glattrandig	++	+	+	+	−
2	„ Grünwald hell, bröckelig	++	++	+	+	−
	„ „ gelbweiß, glattrandig . . .	++	+	+	±	−
3	„ Jürgens hell, bröckelig	++	+	+	+	−
	„ „ gelbweiß, glattrandig	++	++	++	+	−
4	„ Ditthorn hell, glattrandig	++	++	++	++	−
	„ „ trüb, gelbweiß, glattrandig .	++	+	+	±	−
5	„ Förster hell, glattrandig	++	++	++	++	−
	„ „ trüb, gelbweiß, glattrandig! . .	++	+	+	±	−

b) Giftarme Ruhrstämme.

Bei der Untersuchung der Mutationsvorgänge der sogen. giftarmen Ruhrstämme hatte ich es im Gegensatz zu den bisher geschilderten Bakterienarten von vornherein mit einzelnen Gruppen von Stämmen zu tun, die schon an sich kulturell und serologisch untereinander stärker oder schwächer abweichen. Es lag daher die Vermutung nahe, daß diese von vornherein untereinander mehr oder weniger stark verschiedenen Stämme vielleicht auch in dem Aussehen der Mutationsformen deutliche Unterschiede aufweisen würden. Diese Annahme hat sich im Laufe der weiteren Untersuchung zum Teil wenigstens denn auch bestätigt. Es standen mir bei der Prüfung in der Hauptsache vier Gruppen von Kulturen zur Verfügung: einmal eine Anzahl Stämme, die unmittelbar nach ihrer Isolierung auf Grund ihres Verhaltens gegenüber den verschiedenen von Lentz und anderen zur Differenzierung angegebenen Kohlehydraten dem Ruhr Y-Typ zugerechnet werden mußten, weiterhin zwei Stämme der Flexner Ruhrgruppe, ferner zwei Kulturen der Ruhr Stronggruppe, die vom Institut für Infektionskrankheiten dem Laboratorium in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt worden waren, und endlich noch eine Anzahl Kulturen, die von mir im Vorjahre bei epidemisch auftretenden, unter dem klinischen Bild von Ruhr verlaufenden Erkrankungen isoliert worden waren und in kultureller und serologischer Beziehung eine Sonderstellung unter den giftarmen Ruhrerregern einnehmen[1]).

Was nun die Mutationsvorgänge bei den genannten Ruhrstämmen betrifft, so sehen wir bei den Kulturen der Y-Ruhr und der Strong-Ruhr nach der Aussaat aus alten Sammlungsröhrchen auf der Agarplatte einmal helle, durchscheinende Kolonien und dann noch trübe, gelbweiße, undurchsichtige Scheiben von mittlerer Größe, ein Mutationsbild, das wir bei den bisher geschilderten Bakterienarten am häufigsten getroffen haben. Dem verschiedenen Aussehen der mutierten Kolonieformen entsprechend

[1]) Berl. klin. Wochenschr. 1912, Nr. 16.

ist auch der morphologische Unterschied der die Kolonien zusammensetzenden Bakterien. Die hellen, durchscheinenden Kolonieformen bestehen aus größtenteils geraden, mittelschlanken, kurzen oder mittellangen Stäbchen, die trüben, gelbweißen aus sehr kurzen oder kurzen, dicken, plumpen Bazillen.

Besonders hervorheben möchte ich, daß bei den von mir isolierten, oben an vierter Stelle erwähnten Ruhrstämmen 4 von den 6 herausgezüchteten Kulturen schon auf den ersten, zu ihrer Isolierung aus den Fäces benutzten Lackmus-Laktose-Agarplatten in Mutation begriffen waren und ganz verschiedenartige Kolonien gebildet hatten. Es ist dies ein weiterer Beweis dafür, daß diesen Mutationsvorgängen, worauf ich schon bei entsprechenden Untersuchungen über Cholera gelegentlich hingewiesen habe, insofern auch eine wichtige praktische Bedeutung zukommt, als bei der Isolierung pathogener Bakterien aus dem menschlichen Körper schon auf den ersten zum Nachweis der Bakterien benutzten Nährböden Mutationserscheinungen auftreten, und die betreffenden Bakterien dann unter Umständen in Kolonieformen wachsen können, die von dem im allgemeinen als charakteristisch angesehenen Koloniebild recht beträchtlich abweichen. So fand ich bei den vier von mir isolierten mutierenden Dysenterie-Kulturen auf der Blauplatte neben großen, zerfließenden, zackigen Scheiben noch kleine, hellere, glattrandige Kolonien, welche einer ganz anderen Bakterienart anzugehören schienen, aber mit Hilfe des Patientenserums als identisch mit der anderen Kolonieform festgestellt werden konnten. Es bestanden zwischen den Bakterien der verschiedenen Kolonien noch weitgehende morphologische Differenzen, indem die großen, zackigen Kolonien von sehr kurzen, dicken, plumpen Stäbchen gebildet wurden, während die hellen, durchscheinenden aus kurzen, dünneren Bakterien bestanden. Als ich dann von der Blauplatte die verschiedenartigen Kolonien auf die Agarplatte überimpfte, entwickelten sich hier aus den großen zackigen Kolonien wiederum große, zackige, gelbweiße Scheiben und aus den kleinen, glattrandigen des Drigalskischen Nährbodens auf der Agarplatte ebenfalls kleine, glattrandige, helle Kolonien, wie dies in Abbildung 1 der Tafel VIII wiedergegeben ist; dabei blieben die morphologischen Unterschiede der die differenten Kolonien zusammensetzenden Bakterien deutlich erhalten (vergleiche Abbildung 1 und 2 der Tafel XI!). Auch die beiden anderen Dysenteriekulturen, die bei ihrer Gewinnung aus den Fäces nur in Form von großen, zackigen Kolonien gewachsen waren, zeigten nach längerem Stehen der mit ihnen beimpften Agarröhrchen auf Agarplatten wie auf den Drigalskischen Blauplatten die gleiche, plötzlich einsetzende Differenzierung der Kolonien und deren Bakterien.

Die beiden Flexner-Ruhr-Kulturen zeigen beim Auftreten der Mutation auf der Agarplatte ein Wachstum, das dem Mutationsbild der von mir isolierten Stämme vollkommen ähnlich ist. Wir finden also auf dem genannten Nährboden neben großen, trüben, zackigen Kolonien noch kleine, helle, glattrandige Scheibchen. Auch die morphologischen Differenzen der die verschiedenartigen Kolonien zusammensetzenden Bakterien entsprechen den bei meinen Kulturen beschriebenen Verhältnissen. Die großen, zackigen Kolonien werden von sehr kurzen, dicken, plumpen, kokkenähnlichen Stäbchen gebildet, die kleinen, glattrandigen bestehen aus längeren, mittelschlanken, geraden Bazillen.

Bei den giftarmen Ruhrbakterien beobachtet man gewöhnlich das Einsetzen der Mutation nach Aussaat aus 4—5 Wochen alten Kulturen. Auch bei den isolierten Varietäten eines Stammes macht sich ein erneutes Auftreten der Mutation erst nach dieser Zeit wieder geltend. Infolgedessen kann es bei der verhältnismäßig kurzen Lebensfähigkeit der Ruhrbakterien auf künstlichen Nährböden auch hier wie bei der Shiga-Kruse-Ruhr zu einem völligen Absterben der getrennten Varietäten kommen, bevor überhaupt die Mutationsvorgänge von neuem eingesetzt haben. Unterschiede zwischen den einzelnen Typen bestehen nach dieser Richtung nicht.

Auf bestimmten anderen, festen Nährböden, wie z. B. dem Lackmus-Laktose-Agar behalten alle isolierten Mutationsstämme der giftarmen Dysenteriebakterien, wie dies bereits oben von der untersuchten vierten Gruppe der giftarmen Ruhrerreger berichtet wurde, ihr charakteristisches Aussehen; ebenso bleiben auch die morphologischen Unterschiede der Bakterien deutlich ausgeprägt. Die auf der Agarplatte hellen, durchscheinenden Kolonien der mutierten Y-Ruhr-Kulturen und der Strong-Ruhr-Stämme wachsen auf der Blauplatte als feine, dunkelblaue, durchscheinende, die trüben, gelbweißlichen Agarkolonien dagegen als saftigere, trübe, weißlichblaue Scheibchen.

Das Aussehen der Mutationsformen bei den von mir isolierten Kulturen auf der Blauplatte wurde bereits oben beschrieben. Ihnen gleicht auch das Kolonienbild der mutierten Flexner-Ruhr-Stämme auf dem Drigalskischen Nährboden. Wir finden also bei Flexner-Ruhr auf der Blauplatte einmal große, zerfließende, zackige Scheiben und dann kleinere, helle, glattrandige Kolonien. Im Gegensatz zu den Blauplatten zeigen auf Gelatine die überimpften, isolierten Varietäten eines Stammes nicht mehr ihr besonderes Aussehen, während die sie zusammensetzenden Bakterien ihre morphologische Differenzierung gut bewahren und so Aufschluß über die Art des Mutationsstammes geben. Die beiden Varietäten der von mir isolierten Stämme z. B. wachsen auf Gelatineplatten gleichmäßig teils in Form von oberflächlichen, hellen, weinblattförmigen, gezackten Kolonien, teils als tiefliegende, rundliche, gelbliche Scheiben.

Die getrennt fortgezüchteten Varietäten der verschiedenen giftarmen Ruhrstämme wurden ferner noch auf ihr Verhalten gegenüber den verschiedenen, bei den anderen Bakteriengruppen schon benützten Differentialnährböden geprüft. Wie die in Tabelle 33 zusammengefaßten Ergebnisse der Untersuchung erkennen lassen, finden wir bei den einzelnen Kulturen sowohl wie bei den isolierten Mutationsstämmen derselben ziemlich beträchtliche Differenzen im Ausfall der Reaktionen. Es kommt aber diesen Unterschieden keine grundlegende Bedeutung in der Richtung zu, daß ein bestimmter Ausfall der Reaktion als charakteristische Eigenschaft einer besonderen Mutationsart aufzufassen wäre. Bei den Y-Ruhr-Stämmen tritt so z. B. in der Löffler I-Lösung bei der hellen Mutationsart von Y-Ruhr Rimpau eine starke Trübung auf, bei Y-Ruhr Wickler nur eine geringe Trübung und bei Y-Ruhr Giwanski jedoch eine direkte Ausfällung, während diese Nährlösung durch die trübe Varietät von Y-Ruhr Rimpau koaguliert, durch die gleiche Mutationsform von Y-Ruhr Wickler, bezw. Y-Ruhr Giwanski überhaupt nicht angegriffen wird. Bei den beiden Flexner-Ruhr-Kulturen wird die Löffler I-Lösung nur von der kleine, glattrandige Kolonien bildenden Varietät kräftig ausgefällt, von den Bakterien der großen, zackigen Mutationsform wird sie

Tabelle

Nummer	Bezeichnung der Kultur	Löffler I	Löffler II	Lackmus-molke	Milch
1	Y-Ruhr Rimpau hell, durchscheinend	starke Trübung	—	Rötung und feine Trübung	—
	Y-Ruhr Rimpau trüb, undurchsichtig	Koagulation	—	Violettfärbung	—
2	Y-Ruhr Wickler hell, durchscheinend	geringe Trübung	—	Violettfärbung	—
	Y-Ruhr Wickler trüb, undurchsichtig	—	—	„	—
3	Y-Ruhr Giwanski hell, durchscheinend	Koagulation	—	Violettfärbung	—
	Y-Ruhr Giwanski trüb, undurchsichtig	—	—	„	—
4	Y-Ruhr Kähn hell, durchscheinend	starke Trübung	—	Violettfärbung	—
	Y-Ruhr Kähn trüb, undurchsichtig	—	—	„	—
5	Strong-Ruhr II hell, durchscheinend	geringe Koagulation	—	Rötung und Trübung	—
	Strong-Ruhr II trüb, undurchsichtig	„	—	Violettfärbung	—
6	Flexner-Ruhr K. G. A. klein, glattrandig	Koagulation	—	starke Rötung, feine Trübung	—
	Flexner-Ruhr K. G. A. groß, aufgefasert	—	—	„	—
7	Flexner-Ruhr Charbin klein, glattrandig	Koagulation	—	starke Rötung, feine Trübung	—
	Flexner-Ruhr Charbin groß, aufgefasert	„	—	„	—
8	Grohlmann groß, aufgefasert	starke Koagulation	—	Rötung, feine Trübung	—
	Grohlmann klein glattrandig	„	—	„	—
9	Gralow groß, aufgefasert	starke Koagulation	—	Rötung, feine Trübung	—
	Gralow klein, glattrandig	—	—	„	—
10	Bothe groß, aufgefasert	starke Koagulation	—	Rötung, feine Trübung	—
	Bothe klein, glattrandig	—	—	„	—
11	Riemer groß, aufgefasert	starke Koagulation	—	Rötung, feine Trübung	—
	Riemer klein, glattrandig	—	—	„	—
12	Rogge groß, aufgefasert	starke Koagulation	—	Rötung, feine Trübung	—
	Rogge klein, glattrandig	„	—	„	—

33.

Barsiekow I	Barsiekow II	Hetsch	Trauben-zucker- Bouillon	Milch-zucker- Bouillon	Neutral-rotagar
Rötung und Koagulation	geringe Rötung	Rötung und Koagulation	—	—	—
starke Rötung und Trübung	—	„	—	—	—
starke Rötung und Trübung	geringe Blaufärbung	Rötung	—	—	—
starke Rötung	—	„	—	—	—
starke Rötung	—	starke Rötung	—	—	—
„	—	„	—	—	—
Rötung und Koagulation	starke Rötung	Rötung und Trübung	—	—	—
Rötung und starke Trübung	—	Rötung	—	—	—
Rötung und Koagulation	—	Rötung und Trübung	—	—	—
„	—	Rötung und Koagulation	—	—	—
Rötung, starke Trübung	—	Rötung	—	—	—
„	—	„	—	—	—
Rötung, starke Trübung	—	Röt.; stark. Trüb. im unteren Teil	—	—	—
„	—	gering. Röt. (nur im unteren Teil)	—	—	—
starke Rötung u. Koagulation	—	starke Rötung u. Koagulation	—	—	—
„	—	„	—	—	—
starke Rötung u. Koagulation	—	starke Rötung u. Koagulation	—	—	—
„	—	„	—	—	—
starke Rötung u. Koagulation	—	starke Rötung u. Koagulation	—	—	—
„	—	„	—	—	—
starke Rötung u. Koagulation	—	starke Rötung u. Koagulation	—	—	—
„	—	„	—	—	—
starke Rötung u. Koagulation	—	starke Rötung u. Koagulation	—	—	—
„	—	„	—	—	—

dagegen nicht verändert. Umgekehrt verhalten sich zum Teil die Mutationsstämme meiner Kulturen gegenüber diesem Nährboden. Er wird von den in großen, aufgefaserten Kolonien wachsenden Bakterien sämtlicher Stämme kräftig koaguliert; bei 3 Kulturen aber greift die kleine, glattrandige Mutationsform Löffler I-Lösung nicht an, während sie bei den beiden anderen Stämmen, nämlich bei Ruhr Grohl. und Ruhr Rog., den gleichen Reaktionsausfall herbeiführt, wie die andere Varietät der gesamten Kulturen.

Ähnlich wie bei Löffler I liegen die Verhältnisse bezüglich der anderen Nährmedien. Während die Mutationsstämme der letztgenannten Bakteriengruppe, sowie der Flexner-Ruhr-Kulturen in der Lackmusmolke, in Barsiekow I und in der Hetschschen Nährlösung, abgesehen von dem stärkeren Reaktionsausschlag bei der kleinen, glattrandigen Kolonieform von Flexner-Ruhr Charbin in Hetsch, innerhalb der speziellen einzelnen Gruppe sich durchweg gleich verhalten, werden die genannten Nährmedien durch die differenten Mutationsstämme der Y-Ruhr- und Strong-Ruhr-Kulturen in verschiedener Weise beeinflußt. So sehen wir z. B. in der Lackmusmolke bei Y-Ruhr Rimpau hell und Strong Ruhr II hell Rötung und feine Trübung auftreten, bei den entsprechenden trüben Kolonienarten dieser Kulturen, sowie bei den beiden Varietäten von Y-Ruhr Wickler, Y-Ruhr Giwanski und Y-Ruhr Kähn indessen nur eine Violettfärbung. Bei dem Hetschschen Nährmedium finden wir bei Y-Ruhr Rimpau, Y-Ruhr Wickler und Y-Ruhr Giwanski eine graduell verschiedene Veränderung der Lösung, jedoch für die beiden Mutationsformen jeweils in derselben Weise vor sich gehend, während sich bei der hellen Varietät von Y-Ruhr Kähn und Strong-Ruhr II Rötung und Trübung, bei Y-Ruhr Kähn trüb nur einfache Rötung und bei Strong-Ruhr II trüb Rötung und Koagulation der Lackmus-Mannit-Nutrose-Lösung zeigt. Die Barsiekow I-Lösung wird von der hellwachsenden Kolonienart durch Ruhr Rimpau und Y-Ruhr Kähn gerötet und ausgefällt, durch die trübe Varietät nur gerötet und getrübt, während Y-Ruhr Giwanski und Strong-Ruhr II dasselbe Nährmedium durch die Bakterien ihrer beiden Mutationsformen stark röten, bezw. röten und koagulieren.

Nach den Angaben von Lentz (13) und anderen Autoren werden durch die verschiedenen zur Gruppe der giftarmen Dysenteriebazillen gehörigen Stämme unmittelbar nach der Isolierung der Kulturen bestimmte Zuckerarten in charakteristischer Weise beeinflußt, so daß sich nach der Anschauung der genannten Autoren auf Grund dieser Reaktionen eine differentialdiagnostische Scheidung der Stämme in gewisse Untergruppen ermöglichen läßt. Bei den einige Zeit auf künstlichen Nährböden fortgezüchteten Stämmen aber ist diese Differenzierungsmethode wegen des wechselnden Verhaltens solcher Kulturen den betreffenden Zuckerarten gegenüber, wie ich ebenfalls gelegentlich anderer Untersuchungen häufig beobachten konnte, nicht mehr ohne weiteres anwendbar. Es war nun mit der Möglichkeit zu rechnen, daß dieses später wechselnde Verhalten der Kulturen gegenüber den Kohlehydraten vielleicht mit Mutationsvorgängen in einem gewissen Zusammenhang stehen könnte. Ich impfte daher jeweils die beiden Mutationsstämme einer Anzahl Kulturen, die nach der obigen Differenzierungsmethode verschiedenen Untergruppen zugerechnet werden mußten, auf Lackmus-Mannit-Agar, Lackmus-Maltose-Agar und Lackmus-Saccharose-Agar über. Das

Resultat dieser Prüfung, bei der zur Kontrolle je 1 Shiga-Kruse-Ruhr-Stamm herangezogen wurde, ist in Tabelle 34 wiedergegeben. Aus den Untersuchungen geht hervor, daß die Veränderungen, welche auf den genannten Nährböden durch die getrennten Varietäten der drei Unterarten herbeigeführt werden, nicht für eine bestimmte Mutationsform der einzelnen Stämme spezifisch sind, und daß somit der abweichende Ausfall

Tabelle 34.

Nr.	Bezeichnung der Kultur	Lackmus-Mannit-Agar	Lackmus-Maltose-Agar	Lackmus-Saccharose-Agar
1	Y-Ruhr Rimpau hell, durchscheinend	Rotfärbung	Rotfärbung	Blaufärbung
	„ „ gelb, undurchsichtig	„	„	Rotfärbung
2	„ Wickler hell, durchscheinend	Rotfärbung	Rotfärbung	Blaufärbung
	„ „ gelb, undurchsichtig	„	„	„
3	„ Giwanski hell, durchscheinend . . .	Rotfärbung	Blaufärbung	Blaufärbung
	„ „ gelb, undurchsichtig	„	„	„
4	„ Kähn hell, durchscheinend	Rotfärbung	Blaufärbung	Blaufärbung
	„ „ gelb, undurchsichtig	„	„	„
5	Strong I-Ruhr hell, durchscheinend	Rotfärbung	Rotfärbung	Rotfärbung
	„ „ gelb, undurchsichtig	„	„	„
6	Strong II- „ hell, durchscheinend	Rotfärbung	Rotfärbung	Blaufärbung
	„ „ gelb, undurchsichtig	„	Blaufärbung	„
7	Flexner-Ruhr Charbin klein, glattrandig . . .	Rotfärbung	Rotfärbung	Blaufärbung
	„ „ „ groß, aufgefasert . . .	„	„	„
8	„ „ K. G. A. klein, glattrandig . . .	Rotfärbung	Rotfärbung	Blaufärbung
	„ „ „ groß, aufgefasert . . .	„	„	„
9	Grohlmann groß, aufgefasert	Rotfärbung	Rotfärbung	Blaufärbung
	„ klein, glattrandig	„	„	„
10	Rogge groß, aufgefasert	Rotfärbung	Rotfärbung	Blaufärbung
	„ klein, glattrandig	„	„	„
11	Gralow groß, aufgefasert	Rotfärbung	Rotfärbung	Blaufärbung
	„ klein, glattrandig	„	„	„
12	Riemer groß, aufgefasert	Rotfärbung	Rotfärbung	Blaufärbung
	„ klein, glattrandig	„	„	„
13	Bothe groß, aufgefasert	Rotfärbung	Rotfärbung	Blaufärbung
	„ klein, glattrandig	„	„	„
14	Shiga Kruse-Ruhr	Blaufärbung	Blaufärbung	Blaufärbung

der Reaktion bei älteren Kulturen gegenüber dem ursprünglichen Verhalten kurz nach der Isolierung nicht mit den Mutationsvorgängen in Verbindung gebracht werden kann. So bewirkten z. B. die beiden Kolonienarten von Y-Ruhr Giwanski und Y-Ruhr Kähn auf den drei Nährböden später Veränderungen, die denen der Y-Ruhr-Stämme entsprechen; Y-Ruhr Wickler hell und gelb, sowie Y-Ruhr Rimpau hell zeigten dagegen auf den Platten ein den Flexner-Ruhr-Kulturen entsprechendes Verhalten, während Y-Ruhr Rimpau gelb ebenso wie Strong-Ruhr I hell und gelb sämtliche Platten röteten und sich somit hinsichtlich ihres Wachstums in keine der von Lentz angegebenen Untergruppen einreihen ließen. Bei Strong-Ruhr II verhält sich die

helle Varietät wie Flexner-Ruhr, die trübe Kolonien bildende Mutationsform aber wie Y-Ruhrstämme. Die beiden Flexner-Ruhr-Stämme und die von mir isolierten Kulturen zeigen sämtlich übereinstimmend sowohl bei der auf der Agarplatte große, trübe, aufgefaserte Kolonien bildenden Varietät wie bei der in Form der kleinen, glattrandigen, durchscheinenden Kolonien wachsenden einen Abbau der Kohlenhydrate, wie er von den Flexner-Ruhr-Stämmen herbeigeführt wird.

Bezüglich des agglutinatorischen Verhaltens der beiden Mutationsformen der verschiedenen Kulturen führten die nach dieser Richtung hin vorgenommenen Untersuchungen zu auffallenden Ergebnissen. Zur Verwendung kam zunächst ein Flexner-Ruhr-Kaninchenserum vom Titer 1 : 6000, mit dem die Varietäten sämtlicher Stämme geprüft wurden. Wie aus Tabelle 35 hervorgeht, wurden nur die hellen Kolonien von Y-Ruhr Rimpau und Y-Ruhr Wickler bei einer Verdünnung von 1 : 5000, die von Strong-Ruhr II bei einer Verdünnung von 1 : 500 von dem genannten Serum agglutiniert; bei den trüben Kolonieformen der gleichen Kulturen, sowie bei den beiden Mutationsarten aller anderen Stämme läßt sich überhaupt keine agglutinatorische Beeinflussung durch das Flexnerserum feststellen, ob-

Tabelle 35.

Agglutination mit Ruhr Flexner-Kaninchenserum vom Titer 1 : 6000.

Nr.	Bezeichnung der Kultur	Serumverdünnung				Kochsalzlösung
		1 : 100	1 : 500	1 : 1000	1 : 5000	
1	Y-Ruhr Rimpau hell, durchscheinend .	+++	+++	++	+	−
	„ „ gelb, undurchsichtig .	−	−	−	−	−
2	„ Wickler hell, durchscheinend .	+++	+++	++	±	−
	„ „ gelb, undurchsichtig .	−	−	−	−	−
3	„ Giwanski hell, durchscheinend .	−	−	−	−	−
	„ „ gelb, undurchsichtig .	−	−	−	−	−
4	„ Kähn hell, durchscheinend . .	−	−	−	−	−
	„ „ trüb, undurchsichtig . .	−	−	−	−	−
5	Strong-Ruhr II hell, durchscheinend. .	+++	+	−	−	−
	„ „ trüb, undurchsichtig . .	−	−	−	−	−
6	Grohlmann groß, aufgefasert	−	−	−	−	−
	„ klein, glattrandig	−	−	−	−	−
7	Rogge groß, aufgefasert	−	−	−	−	−
	„ klein, glattrandig	−	−	−	−	−
8	Gralow groß, aufgefasert	−	−	−	−	−
	„ klein, glattrandig	−	−	−	−	−
9	Riemer groß, aufgefasert	−	−	−	−	−
	„ klein, glattrandig	−	−	−	−	−
10	Bothe groß, aufgefasert	−	−	−	−	−
	„ klein, glattrandig	−	−	−	−	−
11	Flexner-Ruhr K. G. A. klein, glattrandig	+++	+++	+++	±	−
	„ „ „ groß, aufgefasert	−	−	−	−	−
12	„ „ Charbin klein, glattrandig	+++	+++	+++	++	−
	„ „ „ groß, aufgefasert	−	−	−	−	−

wohl Y-Ruhr Giwanski und Y-Ruhr Kähn vor etwa zwei Jahren bei ihrer Isolierung durch dasselbe Serum bei einer Verdünnung von 1 : 3000 noch kräftig agglutiniert worden waren[1]). Auch bei den zwei Flexner-Ruhr-Stämmen finden wir eigenartige agglutinatorische Verhältnisse. Es werden von dem genannten Serum in beiden Fällen nur die in kleinen, glattrandigen Kolonien wachsenden Bakterien bis zur Serumtitergrenze agglutiniert, während die Bakterien des großen, aufgefaserten Mutationsstammes nicht einmal bei der hohen Konzentration von 1 : 100 vom Serum beeinflußt werden. Der auffallende Gegensatz im agglutinatorischen Verhalten zwischen den beiden getrennten Mutationsstämmen der Y-Ruhr Rimpau und Y-Ruhr Wickler, ferner bei Strong-Ruhr II und Flexner-Ruhr veranlaßte mich dann, mit Hilfe der getrennten Mutationsstämme besondere Immunsera herzustellen und mit diesen die eigenartigen Agglutinabilitätsverhältnisse bei den genannten Kulturen weiter zu verfolgen. Aus dem Ergebnis der Untersuchungen, die in Tabelle 36 übersichtlich zusammengestellt sind, ersehen wir, daß von dem mit der hellen Mutationsart der Y-Ruhr Rimpau hergestellten Kaninchenimmunserum die zugehörigen hellen Varietäten von Y-Ruhr Rimpau und Y-Ruhr Wickler bei einer Verdünnung von 1 : 5000 noch deutlich beeinflußt werden, während die trüben Kolonieformen derselben Kulturen wiederum vollständig inagglutinabel bleiben. Das mit der gelben, trüben Varietät der Y-Ruhr Rimpau gewonnene Immunserum agglutiniert die Bakterien der entsprechenden, also der trüben Kolonienart bei den genannten Kulturen schwach bei einer Verdünnung von 1 : 500, dagegen die Bakterien der anderen, also der hellen, durchscheinenden

Tabelle 36.

Nummer	Bezeichnung der Kultur	Serumverdünnung 1:100	1:500	1:1000	1:5000	Kochsalzkontrolle	Verwendetes Serum
1	Y-Ruhr Rimpau hell, durchscheinend	+++	+++	++	+	—	Y-Ruhr Rimpau hell = Kaninchenserum
	„ „ gelb, undurchsichtig	—	—	—	—	—	
2	„ Wickler hell, durchscheinend	+++	+++	++	±	—	
	„ „ gelb, undurchsichtig	—	—	—	—	—	
3	„ Rimpau hell, durchscheinend	+++	+++	++	+	—	Y-Ruhr Rimpau gelb = Kaninchenserum
	„ „ gelb, undurchsichtig	++	±	—	—	—	
4	„ Wickler hell, durchscheinend	+++	+++	++	+	—	
	„ „ gelb, undurchsichtig	++	±	—	—	—	
5	Strong-Ruhr II hell, durchscheinend	+++	++	+++	++	—	Strong-Ruhr II hell = Kaninchenserum
	„ „ gelb, undurchsichtig	—	—	—	—	—	
6	„ „ hell, durchscheinend	+++	++	++	—	—	Strong-Ruhr II gelb = Kaninchenserum
	„ „ gelb, undurchsichtig	+	—	—	—	—	
					(1:3000)		
7	Flexner-Ruhr K. G. A. klein, glattrandig	+++	+++	++	++	—	Flexner-Ruhr klein, glattrandig = Kaninchenserum Titer 1:3000
	„ „ „ groß, aufgefasert	—	—	—	—	—	
8	„ „ Charbin klein, glattrandig	+++	+++	++	++	—	
	„ „ „ groß, aufgefasert	—	—	—	—	—	

[1]) Mit diesen Stämmen sind inzwischen weitere Untersuchungen bezüglich ihres agglutinatorischen Verhaltens ausgeführt worden, über die an anderer Stelle berichtet werden soll.

Kolonieform sogar noch bei der 10fach größeren Verdünnung von 1 : 5000 kräftig. Ähnlich liegen die Verhältnisse bei der Strong-Ruhr: durch das Kaninchenimmunserum des hellwachsenden Mutationsstammes wird die zugehörige Varietät bei Verdünnung 1 : 5000 kräftig agglutinatorisch beeinflußt, während die trübwachsende Form der nämlichen Kultur ganz inagglutinabel bleibt. Anderseits findet bei Verwendung eines mit der trüben Varietät von Strong-Ruhr II gewonnenen Kaninchenimmunserums eine Einwirkung desselben auf die Bakterien der gleichen Kolonie kaum noch bei der hohen Konzentration 1 : 100 statt, während die Bakterien der heterologen, hellen Kolonienart von Strong-Ruhr II von dem Serum bei der 10fach höheren Verdünnung von 1 : 1000 stark agglutiniert werden. Wir sehen also bei diesen zwei Untergruppen der giftarmen Dysenteriekulturen dieselben auffallenden agglutinatorischen Differenzen zwischen den einzelnen Mutationsformen, wie dies der Fall war bei den isolierten Varietäten der Bac. enterid. Gaertner-Stämme. Bei den Flexner-Ruhr-Kulturen stand mir vorerst nur ein Serum, das mit den Bakterien der kleinen, glattrandigen Kolonieform von Kaninchen gewonnen worden war, zur Verfügung. Von diesem Kaninchenimmunserum wurden, wie gleichfalls aus Tabelle 36 hervorgeht, nur die kleine, glattrandige Kolonien bildenden Mutationsstämme beider Kulturen bis zur Titergrenze kräftig beeinflußt, die Bakterien der anderen Varietät wurden beide Male nicht einmal bei der Serumkonzentration von 1 : 100 agglutiniert.

Tabelle 37.

Nr.	Bezeichnung der Kultur	Serumverdünnung				Kochsalzkontrolle	Verwendetes Serum
		1 : 100	1 : 500	1 : 1000	1 : 3000		
1	Ruhr Grohlmann groß, aufgefasert .	+++	++	+	±	−	Ruhr Grohlmann klein, glattrandig = Kaninchenserum
	„ „ klein, glattrandig .	+++	+++	+++	+	−	
2	„ Rogge groß, aufgefasert . .	++	+	±	−	−	
	„ „ klein, glattrandig . .	+++	+++	+++	++	−	
3	„ Gralow groß, aufgefasert . .	+++	+++	++	+	−	
	„ „ klein, glattrandig . .	+++	+++	++	+	−	
4	„ Bothe groß, aufgefasert . . .	++	++	+	±	−	
	„ „ klein, glattrandig . .	++	++	+	±	−	
5	„ Riemer groß, aufgefasert . .	++	++	±	−	−	
	„ „ klein, glattrandig . .	+++	+++	+++	+++	−	
6	Ruhr Grohlmann groß, aufgefasert .	++	+	±	−	−	Ruhr Grohlmann groß, aufgefasert = Kaninchenserum
	„ „ klein, glattrandig .	++	+	±	−	−	
7	„ Rogge groß, aufgefasert . .	++	+	+	−	−	
	„ „ klein, glattrandig . .	+	+	−	−	−	
8	„ Gralow groß, aufgefasert . .	++	+	+	−	−	
	„ „ klein, glattrandig . .	+	+	−	−	−	
9	„ Bothe groß, aufgefasert . . .	++	+	+	−	−	
	„ „ klein, glattrandig . .	++	+	+	−	−	
10	„ Riemer groß, aufgefasert . .	+	±	−	−	−	
	„ „ klein, glattrandig . .	+++	+++	++	+	−	

Ein von den anderen drei Gruppen völlig abweichendes Bild ergab die Prüfung mittels spezifischer Immunsera bei den getrennten Kolonieformen der von mir gezüchteten Stämme. So zeigen die in Tabelle 37 wiedergegebenen Untersuchungen, daß z. B. von dem mit Hilfe der kleinen, hellen, glattrandigen Kolonienart hergestellten Serum die beiden Varietäten entweder annähernd gleich stark wie bei Ruhr Grohlmann, Gralow und Bothe, oder wie bei Ruhr Riemer und Rogge die Bakterien der entsprechenden Varietät um einen Verdünnungsgrad höher agglutiniert werden. Wir sehen also keine nennenswerte spezifische Wirkung des Serums zugunsten des homologen Mutationsstammes. Wird bei der Prüfung ein Immunserum der großen, trüben, aufgefaserten Kolonieform verwendet, so erfolgt ebenfalls kein spezifischer Ausschlag der Reaktion: so werden z. B. die Bakterien der beiden Mutationsarten von Ruhr Grohlmann und Bothe gleichmäßig bei Verdünnung 1 : 1000, dagegen diejenigen der dem Serum entsprechenden großen, trüben Kolonieform von Ruhr Rogge und Gralow um einen Verdünnungsgrad stärker als die der heterologen Varietät agglutiniert, während umgekehrt bei Ruhr Riemer die Bazillen der kleinen, glattrandigen Kolonieform vom Serum noch bei Verdünnung 1 : 3000 gut agglutinatorisch beeinflußt werden im Gegensatz zu der dem Serum entsprechenden großen, trüben, aufgefaserten Varietät, deren Bakterien kaum bei einer Konzentration des Serums von 1 : 500 eine Einwirkung desselben erkennen lassen.

VII. Bact. coli commune.

Die Untersuchungen über die Mutationsvorgänge bei Bact. coli sind von mir gelegentlich der Prüfung von verschiedenen Blutalkaliagarnährböden auf ihre Elektivität für Choleravibrionen aufgenommen worden. Es hatte sich dabei gezeigt, daß bei unmittelbarer Abimpfung von einzelnen Bact. coli-Kolonien, die sich auf den genannten Nährsubstraten entwickelt und auf diesen undurchsichtigen Nährböden keine nennenswerten Differenzen im Aussehen gezeigt hatten, auf der Agarplatte häufig zwei stark voneinander abweichende Kolonieformen wuchsen: einmal helle, nur wenig getrübte Scheiben und saftigere, gelblichweiße, irisierende Formen. Die differenten Kolonien wurden stets von morphologisch verschiedenen Bakterien gebildet. Da ich sofort mit der Möglichkeit rechnete, daß es sich hier ebenfalls um Mutationsvorgänge bei Bact. coli-Stämmen handeln könnte, impfte ich die getrennten Kolonieformen auf Agarröhrchen über, aus denen ich in kurzen, mehrtägigen Zwischenräumen auf Agarplatten Ausstriche anlegte. Als die Agarröhrchen, die mit den trüben Kolonieformen beimpft worden waren, etwa 4—5 Wochen lang gestanden hatten, entwickelten sich plötzlich auf der Agarplatte nach der Aussaat neben den sehr zahlreichen saftigen, gelblich-weißen Kolonien noch vereinzelte helle, matt durchscheinende Formen, die sich aus besonderen, von den erstgenannten morphologisch differenten Bakterien zusammensetzten. Ähnlich bildeten sich nach Abimpfung von etwa 6 Wochen alten Agarröhrchen der hellen Kolonieformen auf der Agarplatte plötzlich unter den zahlreichen dem Ausgangsmaterial entsprechenden Kolonien verstreut einzelne trübe, saftige, irisierende Scheibchen, die sich aus anders gestalteten Individuen zusammensetzten. Also auch hier hatte ich bei einer großen Zahl von frisch gezüchteten Bact. coli-Stämmen unmittelbar nach

ihrer Isolierung bereits auf den zu ihrer Züchtung aus den Fäces verwendeten Platten Mutationserscheinungen feststellen können. Bei weiteren systematischen Nachprüfungen dieser Beobachtung unter gleichzeitiger Benützung älterer Laboratoriumsstämme erhielt ich immer entsprechende Befunde. Es lassen sich also, wie aus Figur 2 der Tafel VIII ersichtlich ist, bei mutierenden Bact. coli-Kulturen auf der Agarplatte regelmäßig zwei bestimmte Kolonieformen beobachten: einmal helle, schwach getrübte Kolonien und dann noch saftigere, trübe, gelblichweiße, irisierende Scheibchen. Der hellen Kolonieform entsprechen kurze oder mittellange, schlanke, gerade Stäbchen, die trüben irisierenden Scheibchen bestehen aus sehr kurzen oder kurzen, dicken, plumpen, manchmal kokkenähnlichen Bazillen. Diese Differenzen sind in den Abbildungen 3 und 4 der Tafel XI wiedergegeben.

Bei meinen bisherigen an einer großen Anzahl von Kulturen von Bact. coli durchgeführten Untersuchungen konnte ich ähnlich wie bei Cholera nur eine Mutationsgruppe mit den beiden beschriebenen Mutationsformen feststellen. Eine weitere Ähnlichkeit mit Cholera machte sich bei den Mutationsvorgängen des Bact. coli ferner auch in der Richtung geltend, als die Mutationserscheinungen bei den isolierten Varietäten der Bact. coli-Stämme im Gegensatz zu den bei Typhus und Paratyphus gemachten Erfahrungen verhältnismäßig früh, und zwar bei der trüben Mutationsform viel zeitiger als bei der hellen Kolonienart wieder auftreten. Ebenso setzen sie im allgemeinen bei den ganz frisch aus dem Körper gezüchteten Stämmen früher ein als bei alten Laboratoriumsstämmen. Daß man bei der Isolierung von Bact. coli aus dem Körper mit dem Vorkommen von Mutation häufig rechnen muß, habe ich bereits oben erwähnt. Überraschend war es für mich, daß ich bei sämtlichen, von mir geprüften Bact. coli-Kulturen stets nur das gleiche Mutationsbild und nicht wie bei Typhus und Paratyphus mehrere Gruppen von Mutationsstämmen fand, obwohl die Bact. coli-Gruppe zwar kulturell übereinstimmende, serologisch aber differente Bakterien umfaßt. Immerhin ist es möglich, daß im Laufe weiterer Untersuchungen vielleicht noch andere Mutationstypen gefunden werden.

Nach Übertragung auf andere feste Nährböden, wie z. B. Lackmus-Laktose-Agar bleiben die Unterschiede sowohl zwischen den beiden Kolonienarten wie zwischen den differenten Bakteriengruppen deutlich erhalten, wenn auch der Gegensatz zwischen den verschiedenen Kolonieformen auf der Blauplatte nicht so stark zutage tritt wie auf der Agarplatte. Eigenartig war auf diesem Nährboden das Verhalten der Mutationsstämme von einigen von mir isolierten Bact. coli-Kulturen, welche zwar bei 8tägiger Beobachtung auf den Differentialnährböden in der charakteristischen Weise wuchsen, auf dem Drigalskischen Nährboden jedoch innerhalb 24 Stunden blaue Kolonien bildeten. Impfte ich nämlich die isolierten Mutationsformen dieser Kulturen auf Blauplatten, bezw. auf Endo-Nährböden, so entwickelten sich vom dritten Tage ab bei diesen Stämmen wie beim Bact. coli mutabile sowohl auf den blauen Kolonien der Drigalski-Platten wie auf der farblosen des Endo-Nährbodens zahlreiche weiße (Drigalski-), bezw. rote (Endo-Nährboden) Knöpfe, und zwar gleichmäßig bei den Stämmen beider Mutationsformen. Die aus den Knöpfen der beiden Mutanten gezüchteten Tochterkolonien hatten die Fähigkeit, Laktose aufzuspalten, und bildeten also auf dem

Lackmus-Laktose-Agar, bezw. dem Endo-Nährboden rote Kolonien. Zugleich konnte ich aber durch Kontrollplatten von Agar feststellen, daß die aus den Knopfkolonien gewonnenen Tochterstämme die sonstigen Eigenschaften der auf den zuckerhaltigen Nährböden blau, bezw. farblos (Endo) wachsenden Mutterkolonien beibehalten hatten, daß also die Laktose vergärenden Knopfkolonien der hellen Varietät auf Agar wieder in Form heller, durchscheinender Kolonien mit längeren, schlanken Bazillen wuchsen, andererseits der entsprechende Tochterstamm der trüben Varietät auf Agar trübe, undurchsichtige Scheibchen bildete, die aus kurzen, plumpen Stäbchen bestanden. Wir sehen also bei jeder der untersuchten Kulturen außer den beiden oben beschriebenen Mutationsstämmen (primäre Mutation) noch eine 3. und 4. Varietät plötzlich auftreten, die sich von den beiden Mutterarten nur durch eine neue Eigenschaft, nämlich durch die Laktosevergärung, unterscheiden (sekundäre Mutation). Erwähnen möchte ich noch, daß bei der Kultur Bact. coli Lanzius, die durch die Bildung eines auf den verschiedensten Nährböden z. B. auch auf der Drigalskischen Blauplatte auftretenden, gelblich-braunen Farbstoffes ausgezeichnet ist, sämtliche vier Varietäten diese Farbstoff produzierende Fähigkeit besitzen. Auch bei den isolierten, Laktose aufspaltenden, sekundären Mutationsstämmen kommt es regelmäßig wieder zu einem neuen Auftreten der Mutation, bezw. zu atavistischen Rückschlägen, und zwar setzen diese Vorgänge, nämlich der Rückschlag zu den entsprechenden, Zucker nicht vergärenden Ursprungsmutationsformen, im allgemeinen bei Züchtung auf Agar bereits nach 6—8 Tagen ein.

Ich prüfte dann weiter das Verhalten der verschiedenen Mutationsstämme bei zahlreichen Kulturen auf den für die Differentialdiagnose der Typhus-Coli-Gruppe angegebenen Nährböden. Aus den Untersuchungen, deren Ergebnis in Tabelle 38 zusammengefaßt ist, geht hervor, daß im allgemeinen die einzelnen Kulturen untereinander inbezug auf den Ausfall einer und derselben Reaktion ziemlich beträchtliche Abweichungen zeigen können, während wir bei den beiden Mutationsarten eines Stammes im wesentlichen nur verhältnismäßig geringgradige, graduelle Abstufungen im kulturellen Verhalten finden. Nur bei dem Wachstum in Milch ergeben sich eigenartige Verhältnisse, indem diese von einzelnen Mutationsstämmen auch während einer längeren Beobachtungszeit nicht verändert wird. Allerdings findet sich ein derartiger Ausfall der Reaktion bei den auf der Blauplatte typisch in roten Kolonien wachsenden Bact. coli-Stämmen nur in einem Fall, nämlich bei der hellen Varietät von Bact. coli P_{38}, hingegen sehen wir einfache Säuerung der Milch ohne Koagulation verhältnismäßig häufig bei den auf dem Lackmus-Laktose-Agar blauwachsenden Bact. coli-Kulturen eintreten. Aber auch hier ist diese Reaktion nicht für eine bestimmte Kolonienart spezifisch. Denn bei den Kulturen Freytag und Lanzius wird die Milch zwar von den hellen Mutationsstämmen koaguliert und von den zugehörigen trüben nicht weiter verändert, aber bei Kultur P_{38} liegen die Verhältnisse gerade umgekehrt: hier erfolgt Milchgerinnung nur bei den Bakterien der trüben Kolonien, nicht aber bei denen des hellen Mutationsstammes. Bei den blauwachsenden Bact. coli-Kulturen zeigt sich auch verschiedentlich in der Löffler II-Lösung an Stelle der üblichen Koagulation nur einfache Trübung. Dieser Ausfall der Reaktion vollzieht sich hier ebenfalls unabhängig von der Art des Mutationsstammes. So finden wir z. B. bei

Tabelle

Nr.	Bezeichnung der Kultur		Löffler I	Löffler II	Barsiekow I	Barsiekow II
1	Bact. coli P_2	hell	Koagulation, Trübung	Koagulation, Trübung,	Rötung und Koagulation	Rötung und Koagulation
	„ „ P_2	trüb	„	„	„	„
2	Bact. coli P_7	hell	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Rötung und Koagulation	Rötung und Koagulation
	„ „ P_7	trüb	„	„	„	„
3	Bact. coli P_8	hell	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Rötung und Koagulation	Rötung und Koagulation
	„ „ P_8	trüb	„	„	„	„
4	Bact. coli P_{10}	hell	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Rötung und Koagulation	Rötung und Koagulation
	„ „ P_{10}	trüb	„	„	„	„
5	Bact. coli P_{12}	hell	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Rötung und Koagulation	Rötung und Koagulation
	„ „ P_{12}	trüb	„	„	„	„
6	Bact. coli P_{25}	hell	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Rötung und Koagulation	Rötung und Koagulation
	„ „ P_{25}	trüb	„	„	„	„
7	Bact. coli P_{32}	hell	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Rötung und Koagulation	Rötung und Koagulation
	„ „ P_{32}	trüb	„	„	„	„
8	Bact. coli P_{35}	hell	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Rötung und Koagulation	Rötung und Koagulation
	„ „ P_{35}	trüb	„	„	„	„
9	Bact. coli P_{36}	hell	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Rötung und Koagulation	Rötung und Koagulation
	„ „ P_{36}	trüb	„	„	„	„
10	Bact. coli P_{38}	hell	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Rötung und feine Trübung	geringe Rötung, feine Trübung
	„ „ P_{38}	trüb	„	„	Rötung und Koagulation	Rötung und Koagulation
11	Bact. coli P_{41}	hell	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Rötung und Koagulation	Rötung und Koagulation
	„ „ P_{41}	trüb	„	„	„	„
12	Bact. coli P_{42}	hell	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Rötung und Koagulation	Rötung und Koagulation
	„ „ P_{42}	trüb	„	„	„	„

38.

Hetsch	Milch	Lackmus-molke	Trauben-zucker- Bouillon	Milch-zucker- Bouillon	Neutralrot-agar	Orzeïnagar
Rötung, Koagulation	Koagulation	starke Rötung, Trübung	—	—	—	—
„	„	„	—	—	—	—
Rötung, Koagulation, Gasbildung	Koagulation	starke Rötung, Trübung	Gasbildung	Gasbildung	Aufhellung, Gasbildung, Fluoreszenz	beginnende Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Rötung, Koagulation, Gasbildung	Koagulation	starke Rötung, Trübung	Gasbildung	Gasbildung	Gasbildung	beginnende Aufhellung
„	„	„	„	„	Gasbildung, Aufhellung, Fluoreszenz	„
Rötung, Koagulation, Gasbildung	Koagulation	starke Rötung, Trübung	Gasbildung	Gasbildung	Gasbildung, Aufhellung, Fluoreszenz	starke Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Rötung, Koagulation, Gasbildung	Koagulation	starke Rötung, Trübung	Gasbildung	Gasbildung	Gasbildung, Aufhellung, Fluoreszenz	geringe Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Rötung, Koagulation, Gasbildung	Koagulation	Rötung und Trübung	Gasbildung	Gasbildung	Gasbildung, Aufhellung, Fluoreszenz	geringe Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Rötung, Koagulation, Gasbildung	Koagulation	starke Rötung, Trübung	Gasbildung	Gasbildung	Gasbildung, Aufhellung, Fluoreszenz	Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Rötung, Koagulation, Gasbildung	Koagulation	starke Rötung, Trübung	Gasbildung	Gasbildung	Gasbildung, Aufhellung, Fluoreszenz	starke Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Rötung, Koagulation, Gasbildung	Koagulation	starke Rötung, Trübung	Gasbildung	Gasbildung	Gasbildung, Aufhellung, Fluoreszenz	starke Aufhellung
„	„	„	„	„	„	geringe Aufhellung
Rötung, Trübung, Gasbildung	—	Rötung, Trübung	Gasbildung	Gasbildung	Gasbildung, geringe Aufhellung	starke Aufhellung
Rötung, Koagulation, Gasbildung	Koagulation	„	„	„	„	geringe Aufhellung
Rötung, Koagulation, Gasbildung	Koagulation	Rötung, Trübung	Gasbildung	Gasbildung	Gasbildung, Aufhellung, Fluoreszenz	—
„	„	„	„	„	„	—
Rötung, Koagulation, Gasbildung	Koagulation	Rötung, Trübung	Gasbildung	Gasbildung	Gasbildung, Aufhellung, Fluoreszenz	geringe Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„

Nr.	Bezeichnung der Kultur	Löffler I	Löffler II	Barsiekow I	Barsiekow II
13	Bact. coli D_5 hell	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Rötung und Koagulation	Rötung und Koagulation
	„ „ D_5 trüb	„	„	„	„
14	Bact. coli D_8 hell	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Rötung und Koagulation	Rötung und Koagulation
	„ „ D_8 trüb	„	„	„	„
*15	Bact. coli Freytag hell	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Rötung und Koagulation	Rötung und Koagulation
	„ „ „ trüb	„	„	„	„
*16	Bact. coli Lanzius hell	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Rötung und Koagulation	Rötung, feine Trübung
	„ „ „ trüb	„	starke Trübung, Aufhellung	„	„
*17	Bact. coli Mecheln hell	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Rötung und Koagulation	—
	„ „ „ trüb	„	starke Trübung, Aufhellung	„	Rötung und Koagulation
*18	Bact. coli Breitenfeld hell	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	Rötung und Koagulation	Rötung und starke Trübung
	„ „ „ trüb	„	„	„	Rötung und Koagulation
*19	Bact. coli Sukow hell	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	starke Trübung	Rötung und Koagulation	Rötung, feine Trübung
	„ „ „ trüb	„	starke Trübung, geringe Aufhell.	„	„
*20	Bact. coli Müller I hell	Koagulation, Trübung, Schaumbildung	starke Trübung, Aufhellung	Rötung und Koagulation	Rötung und Koagulation
	„ „ „ trüb	„	„	„	„

Die mit * bezeichneten Kulturen wuchsen bei Isolierung auf dem Drigalskischen Nähr-

Bact. coli Mecheln und Bact. coli Lanzius nur bei der trüben, bei Bact. coli Sukow und Müller I dagegen bei den beiden Mutationsformen der Stämme statt der Koagulation die einfache Trübung der Nährlösung bei fehlender Schaumbildung. Ähnlich liegen die Verhältnisse noch bei anderen Nährmedien, z. B. Barsiekow II-Lösung, und zwar für blau- wie für rotwachsende Bact. coli-Kulturen. Hier beobachtet man bei der hellen Kolonienart von Bact. coli Mecheln überhaupt keine Veränderung, bei der gleichen Mutationsform von P_{38} und Breitenfeld nur Rötung und Trübung, keine Koagulation wie der anderen Kolonienart dieser Kulturen. Anderseits finden wir aber die gleiche Reaktion in dieser Nährlösung übereinstimmend bei den beiden Mutationsformen von Bact. coli Lanzius, ferner bei allen übrigen Kulturen auch Koagulation

Hetsch	Milch	Lackmus-molke	Trauben-zucker-	Milch-zucker	Neutralrot-agar	Orceïnagar
			Bouillon			
Rötung, Koagulation, Gasbildung	Koagulation	Rötung, Trübung	Gasbildung	Gasbildung	Gasbildung, Aufhellung, Fluoreszenz	geringe Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Rötung, Koagulation, Gasbildung	Koagulation	Rötung, Trübung	Gasbildung	Gasbildung	Gasbildung, Aufhellung, Fluoreszenz	starke Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Rötung, Koagulation, Gasbildung	Koagulation	starke Rötung, Trübung	Gasbildung	Gasbildung	Gasbildung, Aufhellung, Fluoreszenz	Aufhellung
„	—	„	„	„	„	„
Rötung, Koagulation, Gasbildung	Koagulation	Rötung, Trübung	Gasbildung	Gasbildung	Gasbildung, Aufhellung, Fluoreszenz	starke Aufhellung
„	—	„	„	„	„	geringe Aufhellung
Rötung, Koagulation, Gasbildung	Koagulation	Rötung, Trübung	Gasbildung	Gasbildung	Gasbildung, Aufhellung, Fluoreszenz	geringe Aufhellung
Rötung, starke Trüb., Gasbild.	„	„	„	„	„	„
Rötung, Koagulation, Gasbildung	Koagulation	Rötung, Trübung	Gasbildung	Gasbildung	Gasbildung, Aufhellung, Fluoreszenz	geringe Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„
Rötung, Koagulation, Gasbildung	Koagulation	Rötung, feine Trübung	Gasbildung	Gasbildung	Gasbildung, Aufhellung, Fluoreszenz	geringe Aufhellung
„	„	„	„	geringe Gasbildung	„	„
Rötung, Koagulation, Gasbildung	Koagulation	Rötung, Trübung	Gasbildung	Gasbildung	Gasbildung, Aufhellung, Fluoreszenz	geringe Aufhellung
„	„	„	„	„	„	„

boden in Form blauer Kolonien (Bact. coli mutabile).

von Barsiekow II durch die Bakterien der hellwachsenden Bakterien. Ebenso wenig charakteristisch für eine bestimmte Mutationsform sind die beträchtlichen Schwankungen im Wachstum der Bakterien auf Orceïnager. Hervorheben möchte ich noch, daß bei Kultur Bact. coli P_2, die durch den Mangel des Zuckervergärungsvermögens sich von den anderen Bact. coli-Stämmen unterscheidet, übereinstimmend weder durch die Bakterien der hellen, noch durch die der gelben Kolonienart in den verschiedenen Nährlösungen, wie Löffler I und II, Hetsch, Traubenzucker- und Milchzuckerbouillon, sowie in Neutralrotagar eine Gasentwicklung erfolgte.

Die Untersuchung auf Indolbildung bei den einzelnen Mutationsformen wurde an 5 Tage alten Bouillonkulturen nach dem von Kitasato und Salkowski angegebenen

Verfahren mittels Schwefelsäure und Natriumnitrit unter Ausschüttelung mittels Methylalkohol vorgenommen. Aus dem in Tabelle 39 wiedergegebenen Resultat geht hervor, daß das Indolbildungsvermögen sowohl bei den Mutationsformen eines Stammes wie bei den einzelnen geprüften Kulturen beträchtliche Unterschiede aufweist. Diese Differenzen sind indessen nicht von prinzipieller Bedeutung in der Art, daß etwa die Bakterien der einen Mutationsform regelmäßig eine höhere Indolentwicklung herbeiführen. Bei den hellwachsenden Stämmen der Kulturen P_{10}, P_{35} und D_8 finden wir z. B. einen kräftigeren Ausschlag der Reaktion wie bei den trüben Mutationsstämmen. Umgekehrt liegen die Verhältnisse bei den Kulturen P_{32} und P_{41}. Bei der Mehrzahl der Stämme bilden die beiden Mutationsarten gleichmäßig bald wenig, bald reichlich Indol. Auch bei der eben genannten Kultur Bact. coli P_2, die sich von den gewöhnlichen Bact. coli-Stämmen durch den Mangel des Zuckervergärungsvermögens unterscheidet, besteht bei den beiden Varietäten gleichmäßig starke Indolentwickelung.

Tabelle 39.

Nr.	Bezeichnung der Kultur	hellwachsende Bakterien	trübwachsende Bakterien
1	Bact. coli P_2	rosarote Färbung	rosarote Färbung
2	„ „ P_7	tiefbordeaurote Färbung	tiefbordeaurote Färbung
3	„ „ P_8	„	„
4	„ „ P_{10}	„	schwach rosarote Färbung
5	„ „ P_{12}	„	rosarote Färbung
6	„ „ P_{32}	schwach rosarote Färbung	tiefbordeaurote Färbung
7	„ „ P_{35}	tiefbordeaurote Färbung	rosarote Färbung
8	„ „ P_{36}	„	tiefbordeaurote Färbung
9	„ „ P_{38}	rosarote Färbung	rosarote Färbung
10	„ „ P_{41}	—	tiefbordeaurote Färbung
11	„ „ P_{42}	tiefbordeaurote Färbung	„
12	„ „ D_8	„	rosarote Färbung

Auffallend war das Ergebnis der Agglutinationsprüfung bei den daraufhin untersuchten Mutationsstämmen. Da die verschiedenen Bact. coli-Kulturen in serologischer Hinsicht bekanntlich keine Einheit darstellen, so war ich gezwungen, von verschiedenen Stämmen besondere Sera herzustellen und die einzelnen Kulturen damit zu prüfen. Als ich nun bei Bact. coli P_8 die beiden Mutationsstämme mit einem von der hellwachsenden Bakterienart gewonnenen Kaninchenimmunserum daraufhin untersuchte, wurden, wie aus Tabelle 40 hervorgeht, nur die Bakterien der hellwachsenden Kolonien, und zwar bei der hohen Verdünnung von 1 : 3000 noch kräftig agglutiniert, die Bakterien der trüben Mutationsform dagegen zeigen nicht einmal bei der hohen Serumkonzentration von 1 : 100 eine Einwirkung. Das mit der trüben Kolonienform von Bact. coli P_8 hergestellte Kaninchenimmunserum agglutinierte entsprechend den schon bei den Bac. enterid. Gaertner-Kulturen und einer Anzahl giftarmer Dysenteriestämme gemachten Beobachtungen die Bakterien der trüben Mutationsart ebenfalls nur schwach (bei Verdünnung 1 : 100), die der hellen Form dagegen noch in der beträchtlichen

Tabelle 40.

Nummer	Bezeichnung der Kultur	Serumverdünnung 1 : 100	1 : 500	1 : 1000	1 : 3000	Kochsalzkontrolle	Verwendete Serumart
1	Bact. coli Quade hell .	+++	+++	++	±	—	Bact. coli Quade hell = Kaninchenserum
	„ „ „ gelb .	—	—	—	—	—	
2	„ „ P_8 hell . .	+++	+++	++	+	—	Bact. coli P_8 hell = Kaninchenserum
	„ „ „ trüb . .	—	—	—	—	—	
3	„ „ „ hell . .	+++	++	±	—	—	Bact. coli P_8 trüb = Kaninchenserum
	„ „ „ trüb . .	+	—	—	—	—	
4	„ „ P_7 hell . .	+++	+	—	—	—	Bact. coli P_7 trüb = Kaninchenserum
	„ „ „ gelb . .	—	—	—	—	—	
5	„ „ P_{35} hell . .	+++	+++	++	++	—	Bact. coli P_{35} trüb = Kaninchenserum
	„ „ „ trüb . .	++	+	—	—	—	
6	„ „ P_{41} hell . .	+++	++	+	—	—	
	„ „ „ trüb . .	—	—	—	—	—	

Verdünnung von 1 : 1000. Zum gleichen Ergebnis führte die Prüfung noch bei den anderen untersuchten Kulturen, wo z. B. die Bakterien von P_7 hell von dem mittels Bact. coli P_7 trüb gewonnenen Immunserum noch bei 1 : 500 Verdünnung gut, die von P_7 trüb dagegen überhaupt nicht agglutiniert werden. Daß dieses eigenartige, agglutinatorische Verhalten auch dann zu beobachten ist, wenn ein Übergreifen des Immunserums auf einen anderen Stamm stattfindet, sehen wir beispielsweise bei den Kulturen Bact. coli P_{35} und P_{41}. Hier lassen die hellen Kolonienarten von Bact. coli P_{35} und Bact. coli P_{41} noch bei bedeutender Verdünnung des mit dem gelben Mutationsstamm von Bact. coli P_{35} gewonnenen Immunserums eine Einwirkung erkennen, während die homologe, trübe Varietät von Bact. coli P_{35} nur bei der Serumkonzentration 1 : 500, die von Bact. coli P_{41} überhaupt nicht von dem genannten Serum agglutiniert werden. Ganz entsprechend liegen die Verhältnisse bei den auf dem Lackmus-Laktose-Agar blauwachsenden Bact. coli-Stämmen. Wie aus Tabelle 40 hervorgeht, werden bei der Kultur Bact. coli Quade von dem Kaninchenimmunserum Bact. coli Quade hell die Bakterien der beiden verschiedenartigen Mutationsstämme teils bei hoher Serumverdünnung (helle Varietät), teils überhaupt nicht beeinflußt. Ob hier eine konstante Erscheinung bei den blauwachsenden Bact. coli-Kulturen vorliegt, oder ob es sich nur um eine bei Bact. coli Quade beobachtete Erscheinung handelt, konnte ich nicht weiter feststellen, da das benutzte Serum auf andere Kulturen nicht übergriff, und mir Immunsera für die anderen blauwachsenden Bact. coli-Stämme nicht zur Verfügung standen.

VIII. Bac. faecalis alcaligenes.

Auch bei Bac. faecal. alcaligenes rechnete ich mit der Wahrscheinlichkeit, verschiedene Mutationsgruppen mit einem jeweils besonderen Mutationsbild vorzufinden, da wir es bei diesen Stämmen nach den Untersuchungen von Berghaus (14), Döberth (15), Trommsdorff (16), Klimenko (17) und anderen ja nicht mit einer

Tabelle

Nr.	Bezeichnung der Kultur	Löffler I	Löffler II	Barsiekow I	Barsiekow II
1	Alcaligenes I hell .	—	—	geringe Blaufärbung	—
	Alcaligenes I trüb .	—	—	„	—
2	Eickstedt hell . . .	geringe Entfärbung	—	—	—
	Eickstedt trüb . . .	„	—	—	—
3	Hottentott hell . .	—	—	geringe Blaufärbung	—
	Hottentott trüb . .	—	—	„	—
4	217 K hell	—	—	geringe Blaufärbung	—
	217 K trüb	—	—	„	—
5	2931 K hell . . .	geringe Entfärbung	—	—	—
	2931 K trüb . . .	„	—	—	—
6	344 K hell	—	—	—	—
	344 K trüb	—	—	—	—
7	Lichterfelde hell . .	—	—	geringe Blaufärbung	geringe Blaufärbung
	Lichterfelde trüb . .	—	—	„	„
8	3065 Be hell . . .	—	—	—	geringe Blaufärbung
	3065 Be trüb . . .	—	—	—	„
9	3657 Be hell . . .	—	—	—	—
	3657 Be trüb . . .	—	—	—	—
10	2865 Be hell . . .	—	—	—	geringe Blaufärbung
	2865 Be trüb . . .	—	—	—	„

41.

Lackmus-molke	Hetsch	Milch	Trauben-zucker-	Milch-zucker-	Neutralrotagar
			Bouillon		
Tiefblaufärbung	geringe Blaufärbung	Aufhellung, stark alkalisch	unverändert; Wachstum nur im unteren Teil der Röhrchen		Safranfärbung im oberen Teil des Röhrchens
„	„	„	„		„
Tiefblaufärbung	—	Aufhellung, stark alkalisch	unverändert; Wachstum nur im unteren Teil der Röhrchen		Safranfärbung im oberen Teil des Röhrchens
„	—	„	„		„
Tiefblaufärbung	geringe Blaufärbung	Aufhellung, stark alkalisch	unverändert; Wachstum nur im unteren Teil der Röhrchen		Safranfärbung im oberen Teil des Röhrchens
„	„	„	„		„
Tiefblaufärbung	geringe Blaufärbung	Aufhellung, stark alkalisch	unverändert; Wachstum nur im unteren Teil der Röhrchen		starke Safran-färbung im oberen Teil des Röhrchens
„	„	„	„		„
Tiefblaufärbung	geringe Blaufärbung	starke Aufhellung und Alkalisierung	unverändert; Wachstum nur im unteren Teil der Röhrchen		starke Safran-färbung im oberen Teil des Röhrchens
„	„	sehr starke Aufhellung und Alkalisierung	„		„
Blauviolett-färbung	—	geringe Aufhellung und Alkalisierung	unverändert; Wachstum nur im unteren Teil der Röhrchen		starke Safran-färbung im oberen Teil des Röhrchens
„	—	starke Aufhellung und Alkalisierung	„		„
Tiefblaufärbung	geringe Blaufärbung	Aufhellung, stark alkalisch	unverändert; Wachstum nur im unteren Teil der Röhrchen		Safranfärbung im oberen Teil des Röhrchens
„	„	„	„		„
Tiefblaufärbung	—	starke Aufhellung und Alkalisierung	unverändert; Wachstum nur im unteren Teil der Röhrchen		starke Safran-färbung im oberen Teil des Röhrchens
„	—	„	„		„
Tiefblaufärbung	geringe Blaufärbung	Aufhellung und starke Alkalisierug	unverändert; Wachstum nur im unteren Teil der Röhrchen		starke Safran-färbung im oberen Teil des Röhrchens
„	„	unverändert, schw. alkalisch	„		„
Tiefblaufärbung	geringe Blaufärbung	starke Aufhellung und Alkalisierung	unverändert; Wachstum nur im unteren Teil der Röhrchen		starke Safran-färbung im oberen Teil des Röhrchens
„	—	„	„		„

einheitlichen Bakterienart, sondern mit verschiedenen, serologisch von einander abgrenzbaren Untergruppen zu tun haben. Es zeigte sich aber überraschenderweise, daß sämtliche von mir geprüften, amphitrich gegeißelten Stämme der Bac. faecal. alcaligenes-Gruppe in derselben Weise mutierten. Es entwickelten sich beim Einsetzen der Mutationserscheinungen auf der Agarplatte einmal helle, zarte, durchscheinende, ganz schwach irisierende Kolonien und daneben trübe, zarte, undurchsichtige, stark irisierende Scheibchen, wie aus Figur 3 der Tafel VIII ersichtlich ist. Den Unterschieden in der Koloniebildung entsprechen ebenfalls, wie dies in den Abbildungen 5 und 6 der Tafel XI festgehalten ist, weitgehende morphologische Differenzen bei den Bakterien, aus denen sich die verschiedenen Kolonien zusammensetzten. Die hellen Kolonien werden von mehr oder weniger langen, schlanken, manchmal schwach gekrümmten Stäbchen gebildet, die in der Regel gleichmäßig gefärbt sind. Die trüben Kolonien dagegen bestehen aus plumperen, gewöhnlich kürzeren, bipolar oder segmentiert gefärbten, mitunter ebenfalls schwach gekrümmten Bazillen.

Bei der Überimpfung auf andere feste Nährböden z. B. auf den Lackmus-Laktose-Agar, bleiben wiederum die charakteristischen Formen der differenten Bakterien gut erhalten, dagegen zeigen die Kolonien der isolierten Mutationsstämme nur ganz geringe, in der Praxis ziemlich bedeutungslose Unterschiede; die trüben, stark irisierenden Kolonien der Agarplatte wachsen nämlich auf dem Drigalskischen Nährboden etwas heller blau und weniger leuchtend wie die hellen, durchscheinenden, die auf dem Lackmus-Laktose-Agar zarte, dunkelblaue, glänzende Scheibchen bilden. Bei Rückimpfung auf Agar kommen sofort die stark ausgeprägten Unterschiede auch zwischen den beiden Kolonieformen wieder zum Vorschein.

Das weitere kulturelle Verhalten, insbesondere die in Tabelle 41 zusammengestellten Untersuchungen über das Wachstum der beiden Mutationsstämme einer Kultur auf den für die Typhusdiagnose gebräuchlichen Differentialnährböden haben in keinem Nährmedium durchgreifende und praktisch beachtenswerte Differenzen zwischen den beiden Varietäten einer Kultur ergeben. Abgesehen von geringen Abweichungen wie z. B. bei den hellen Kolonienarten von Bac. faecal. Eickstedt und 2931 K in Löffler I finden wir überall denselben Ausfall der Reaktion.

Ähnlich wie bei Bact. coli mußte ich auch bei den Kulturen der Bac. faecal. alcaligenes-Gruppe für die Agglutinationsprüfung der Mutationsstämme einer Kultur besondere Immunsera herstellen, da immer nur eine Anzahl Kulturen gemeinsam von einem und demselben Serum beeinflußt werden. Das Ergebnis der Untersuchungen ist aber von dem bei den Bact. coli-Stämmen gefundenen ganz abweichend, indem hier die Bakterien der beiden differenten Kolonienarten regelmäßig vom zugehörigen Serum bis zur Titergrenze agglutiniert werden. Dabei war es vollkommen gleichgültig, ob bei der Agglutinationsprüfung ein mit der hellen Varietät hergestelltes Immunserum verwendet wurde oder ein solches, das mit Hilfe des trüb wachsenden Mutationsstammes gewonnen worden war.

Nach Abschluß der Untersuchungen erhielt das Laboratorium durch die Liebenswürdigkeit des Herrn Prof. Dr. Lentz einen peritrich gegeißelten Bac. faecal. alcaligenes-Stamm, der in seinem kulturellen Verhalten den oben beschriebenen

Stämmen vollkommen gleicht. Dagegen zeigten sich bei der Mutation in der Koloniebildung gewisse Differenzen. Ich konnte nämlich auf der Agarplatte zwei verschiedene Kolonieformen isolieren und getrennt fortzüchten, von denen die eine helle, zarte, durchscheinende, die andere trübere, saftigere, ganz schwach irisierende Scheibchen darstellt. Auch hier bestanden wieder deutliche morphologische Differenzen zwischen den Bakterien der beiden Mutationsstämme, indem die hellen Kolonien von kurzen, zarten, schlanken Stäbchen, die trüberen von sehr kurzen, dicken, plumpen Bazillen gebildet wurden. Doch sind die Untersuchungen über die verschiedenen Varietäten dieser Kultur noch nicht vollständig abgeschlossen, so daß weitere Mitteilungen darüber noch nicht gemacht werden können.

IX. Kokken.

Die an verschiedenen Kokkenstämmen durchgeführten Untersuchungen auf etwaige Mutationserscheinungen brachten Ergebnisse, die sich in den allgemeinen Rahmen der vorstehend beschriebenen Mutationsvorgänge vollkommen einfügen. Die Nachprüfung der einzelnen gemachten Beobachtungen, insbesondere bei den zahlreichen Farbstoff bildenden, langsam wachsenden Kokkenkulturen ist zurzeit noch nicht vollständig abgeschlossen. Es soll daher im folgenden als Beispiel für die Mutationsvorgänge bei Kokken nur kurz über die Untersuchungsergebnisse bei einem kurze Ketten bildenden Streptokokkenstamm, der aus menschlichen Faeces isoliert wurde, berichtet werden.

Bei der erwähnten Kultur Streptococcus Höh. entwickelten sich beim Einsetzen der Mutationsvorgänge auf der Agarplatte einmal sehr zarte, helle, durchscheinende Kolonien und daneben feinste, trübe, gelblichweiße Scheibchen, wie in der Abbildung 4 der Tafel VIII dargestellt ist. Wenn auch bei den Kokkenkulturen im allgemeinen gewisse morphologische Unterschiede bereits zwischen den einzelnen Bakterien eines Stammes hinsichtlich der Größe bestehen, ferner eine Unterscheidung nach dieser Richtung zwischen einzelnen Kulturen wegen der rundlichen Form gewisse Schwierigkeiten bereitet, so lassen sich doch hier ohne besondere Mühe zwischen den die isolierten Mutationsstämme der Kultur Streptococcus Höh. zusammensetzenden Kokken deutliche morphologische Unterschiede feststellen. Wie aus den Figuren 7 und 8 der Tafel XI hervorgeht, werden die zarten, hellen, durchscheinenden Kolonien von kleinen, feinen Kokken gebildet, die trüberen, gelblichweißen Mutationsformen dagegen bestehen aus etwas größeren, plumperen Kokken.

Die isolierten Mutationsstämme besitzen eine ausgesprochene Konstanz, und man beobachtet erst nach monatelangem Stehen der beimpften Agarröhrchen ein erneutes Auftreten der Mutationsvorgänge.

Beim Überimpfen der beiden getrennt fortgezüchteten Varietäten der genannten Kultur auf andere feste Nährböden z. B. auf Lackmus-Laktose-Agar oder Hammelblutagarplatten bleiben sowohl die Unterschiede zwischen den differenten Kolonien wie auch zwischen den ihnen entsprechenden Kokken gut erhalten. So wachsen z. B. auf dem Drigalskischen Nährboden die hellen, zarten Kolonien der Agarplatte in

Form von hellen, bläulich schimmernden, feinsten Scheibchen, die trüben, gelblich-weißen als undurchsichtige, rötlich-violett schimmernde Kolonien.

Bemerkenswert war das Verhalten der differenten Mutationsformen auf Hammelblutagarplatten in bezug auf das Hämolysierungsvermögen. Bereits nach 24 Stunden konnte ich auf dem genannten Nährboden bei dem hellen Mutationsstamm von Streptococcus Höh. eine ausgeprägte Hämolyse beobachten, während bei der trüben Varietät in wiederholten Versuchen selbst nach 48 Stunden noch keinerlei blutlösende Wirkung zu erkennen war.

Was endlich die agglutinatorischen Verhältnisse bei den isolierten Mutationsstämmen betrifft, so habe ich für die diesbezüglichen Untersuchungen 2 besondere, jeweils mit den Bakterien einer Varietät hergestellte Kaninchenimmunsera verwendet. Die Agglutinationsprüfung ergab zwischen den Kokken der beiden Mutationsformen keine nennenswerten Differenzen; es wurden die Kokken der differenten Kolonienarten von jedem der beiden Sera bis zur Titergrenze (Verdünnung 1 : 10000) gleichmäßig stark agglutiniert.

X. Schluß.

Aus den vorstehend beschriebenen Untersuchungen geht hervor, daß sich anscheinend gesetzmäßig bei allen Bakteriengruppen derartige Abspaltungsvorgänge vollziehen. Ich habe die Erscheinungen als Mutationsvorgänge aufgefaßt, obwohl sie sich von den bisher bei Bakterien als Mutation beschriebenen Erscheinungen erheblich unterscheiden.

Mitteilungen über Mutation bei Bakterien liegen bereits von einer Anzahl Autoren vor. So haben Neisser und Massini (18) ausführlich über mutationsartige Erscheinungen bei einem Bact. coli-Stamm, dem Bact. coli mutabile, berichtet. Der betreffende Stamm bildete zunächst auf dem Endonährboden nur farblose Kolonien, wenn die Überimpfung jeweils innerhalb 24 Stunden stattfand. Erfolgte jedoch die Abimpfung von den farblosen Kolonien nicht am 1. Tage, sondern erst am 3. oder 4. Tage, so wuchsen auf der neu beimpften Endoplatte neben den farblosen auch einzelne intensiv rote Kolonien mit Fuchsinglanz. Bei der Weiterzüchtung blieben diese neuen Kolonien immer konstant, und es wurde nie ein Rückschlag in die farblose Varietät beobachtet.

Diese Mitteilungen über die eigenartige, auf Mutation beruhende Bildung von besonderen, mit einer neuen Eigenschaft ausgestatteten Tochterkolonien bei dem von Neisser als Coli mutabile bezeichneten Bakterienstamm erregten ziemliches Aufsehen und veranlaßten eine Reihe von Autoren zu weiterer Nachprüfung. Im nächsten Jahre wurden bereits von Burk und Reiner Müller (19, 20) die von Neisser und Massini erhobenen Befunde bestätigt. Zugleich berichtete Reiner Müller über interessante Knopfbildung bei den Kolonien verschiedener Stämme der Typhus-Coligruppe, sowie bei Dysenteriekulturen. Die Knopfbildung trat bei den verschiedenen Bakterienarten jeweils nur auf einem bestimmten Zuckernährboden auf. Insgesamt hatte der genannte Autor zu seinen Untersuchungen 18 verschiedene Zuckerarten, bezw. andere, den Nährböden zugesetzte Kohlehydrate herangezogen und dabei beobachtet, daß von

den Bact. coli-Kulturen 2 auf Lackmus-Laktoseagar Kolonien mit Knöpfen bildeten. Die von den Knöpfen abgeimpften Tochterkolonien entwickelten im Gegensatz zu den Stamm-Kolonien bei Weiterimpfung auf dem gleichen Nährboden Säure. 3 andere Stämme zeigten auf Arabinoseagar Knopfbildung, und die von den Knöpfen abgeimpften Tochterkolonien vergoren nunmehr auch die von den Stämmen früher nicht aufgespaltene Galaktose. Ähnlich wuchsen Typhusbazillen auf Isodulzitagar in knopfförmigen Kolonien, ebenso ein Flexner Ruhrstamm, wobei die aus den Knöpfen gezüchteten Kolonien den Isodulzitendoagar wiederum säuerten. Ebenso wurde Knopfbildung festgestellt bei einem Schweineseuchenstamm auf Saccharose-, bei anderen Bakterien noch auf Erythrit-, Dulzit- und Adonit-Agar.

Gegenüber den Mitteilungen von Reiner Müller (20) wurde auf der gleichen mikrobiologischen Tagung der Einwand erhoben, es habe sich möglicherweise um Mischkulturen gehandelt, weil bei der Prüfung der Stämme nicht von Einzellkulturen ausgegangen worden war. Diese Bedenken mußten indessen wegfallen, nachdem Kowalenko (21) bei dem Bact. coli mutabile-Stamm von Neisser und Massini unter Benutzung von Einzellkulturen die gleichen Mutationsvorgänge erzielen konnte.

Weitere Beobachtungen bei Bact. coli-Kulturen in bezug auf eine plötzliche Änderung des Zuckeraufspaltungsvermögens wurden von Burri und Düggeli (22) gemacht. Es gelang den beiden Autoren bei einer Anzahl aus gärendem Gras gezüchteter Colistämme durch Abspaltung aus einer Saccharose nicht vergärenden Rasse eine besondere Varietät zu erhalten, welche die genannte Zuckerart zu vergären vermag, ein Vorgang, der von den Autoren ebenfalls als Mutation gedeutet wurde.

Hübener (23) berichtete auf der mikrobiologischen Tagung des Jahres 1909 über ein Bact. coli, das, je nach den Lebensbedingungen, unter denen es gehalten wurde, bald Säure bald Alkali entwickelte. Er glaubte anfangs das von Neißer und Massini beschriebene Bact. coli mutabile isoliert zu haben, kam aber dann bei weiterer Beobachtung seines Stammes von dieser Anschauung wieder ab. Wie bei Bact. coli mutabile wuchsen auf der Endoplatte beim Hübnerschen Stamm rote und weiße Kolonien, bei denen die Bakterien der roten Kolonien auf den Spezialnährböden die Reaktion des Bact. coli gaben, die der blauen dagegen während der ersten Tage die Reaktionen der Paratyph. B-Bazillen zeigten und erst vom dritten Tage ab sich dem Wachstum des Colityps näherten, z. B. in bezug auf Gasbildung in der Milchzuckerbouillon. Auf dem Milchzuckeragar zeigte sich nach 14 Tagen eine Entwicklung von weißen Knöpfen auf den blauen Grundkolonien; zugleich entstand Rötung in der Umgebung der Knöpfe. Impfte der Autor von den weißen Kolonien auf Fuchsinagar über, so erhielt er weiße und rote Kolonien oder nur weiße ohne Rücksicht auf das Alter der Ausgangsplatte und konnte bei den neuen Stämmen stets die oben erwähnten charakteristischen Reaktionen feststellen. Wurde aber aus der Milchzuckerbouillon der roten Kolonien abgeimpft, so erhielt H. zunächst nur rote Kolonien, erst mit dem Alter der Kultur wuchsen entweder weiße und rote oder nur weiße Kolonien.

Von Reiner Müller (24) erfolgten dann weitere Mitteilungen über 2 verschiedenartige Wachstumstypen bei einigen aus Menschen isolierten Paratyphusstämmen. Diese Kulturen bildeten bei niederen Temperaturen (Zimmertemperatur) auf verschiedenen

gebräuchlichen Nährböden (Agar, Galatine, Lackmus-Laktose-Agar) undurchsichtige, schleimtropfenartige Kolonien. Erzeugt man nun auf der Gelatineplatte von diesen Stämmen weit auseinanderliegende Einzelkolonien, so entwickeln sich nach 4 Wochen seitliche Auswüchse unter den Schleimtropfen hervor in Form von zarten, durchsichtigen Bakterienhäuten vom Aussehen der Typhuskolonien. Impft man von den erwähnten seitlichen Auswüchsen weiter, so erhält man stets nur diese Kolonien ohne Schleimwallbildung. Eine Zurückführung dieser neu entstandenen Varietät in die schleimig wachsende Kolonieform ist dem Autor niemals gelungen. Außerdem vermochte er die beiden Kolonienarten auch auf Grund ihres Wachstums auf dem Raffinoseagar zu trennen.

Ebenfalls mit einem plötzlichen Wechsel des Zuckervergärungsvermögens verbundene Wachstumsvorgänge wurden von Sobernheim und Seligmann (25) bei einem zur Bact. coli-Gruppe gehörigen Stamm beobachtet. Auch hier bildeten sich auf den typhusähnlich wachsenden, blauen Kolonien der Drigalskiplatte knopfartig aufsitzende, sekundäre Kolonien, die im Gegensatz zu den Mutterkolonien bei der Weiterimpfung Laktose aufspalteten und den Nährboden röteten. Die rotwachsenden Tochterkolonien blieben, wie dies von den anderen Autoren ebenfalls betont wurde, im Gegensatz zu den vom dritten Tag jeder neuen Übertragung an wieder frisch mutierenden, blauwachsenden Mutterkolonien konstant.

Die gleichen Autoren teilten ferner mit, daß es ihnen gelungen sei, aus einer dreiviertel Jahre lang aufbewahrten Kultur von Bac. Haustedt nach Aussaat auf dem Drigalskischen Nährboden einen „echten" Gaertnerstamm, einen durch Agglutination von diesem zu trennenden Sonderstamm, einen Typhusstamm und eine dem Coli mutabile sehr nahestehende Kultur zu züchten. Anschließend an diesen auf der Mikrobiologenversammlung des Jahres 1911 gehaltenen Vortrag teilt Reiner Müller (26) einen Fall mit, wo aus Typhusbakterien durch Mutation Paratyphusbazillen entstanden sein sollen.

Seiffert (27) beobachtete bei Bact. coli-Stämmen, die durch systematische Gewöhnung gegen Malachitgrün und chemisch verwandte Körper giftfest gemacht worden waren, daß auf Endoagarplatten nach 2—3tägigem Stehen zwischen den hellen Kolonien, die infolge der Giftfestigkeit das Laktose-Vergärungsvermögen verloren hatten, plötzlich leuchtend rote Kolonien sich entwickelten. Während die weißen Kolonien aber bei der Weiterzüchtung sich stets wieder in weiße und rote Kolonien spalteten, blieb die rotwachsende Varietät konstant. Gleichzeitig hatten aber die Bakterien der roten Kolonien im Gegensatz zu denen der weißen Formen die Eigenschaft erworben, Rohrzucker (in Agarstichkulturen mit 5 % Rohrzuckerzusatz) zu vergären. Diese Eigenschaft erhielt sich dauernd vererbbar, obwohl bei der Fortzüchtung vielfach Passagen von Rohrzucker freiem Agar eingeschaltet wurden.

Jakobsen (28) beschrieb einen frisch aus dem Menschen gezüchteten Typhusstamm, der auf einem wiederholt autoklavierten Lackmus-Laktoseagar in 2 stark verschiedenen Kolonien wuchs, nämlich einmal in Form ganz kleiner, feiner Kolonien und daneben in viel größeren, für Typhus als charakteristisch geltenden Scheiben, die sich aus dem ursprünglich nur kleine Kolonien bildenden Typhusstamm plötzlich

abgespalten hatten. Auch hier gelang eine Zurückführung der großen Kolonien in den kleinen Typ nicht mehr. Die beiden Varietäten zeigten ferner beträchtliche Agglutinationsdifferenzen, indem die erste Varietät gegenüber der anderen, in großen Kolonien wachsenden nur wenig agglutinabel war.

Fassen wir das Ergebnis der vorstehenden Beobachtungen zusammen, so sehen wir bei der Mutation im allgemeinen hauptsächlich nur eine neue Eigenschaft auftreten, die sich meist in der Änderung des Zuckervergärungsvermögens äußert. Diese neue Zucker aufspaltende Fähigkeit ist bei den einzelnen Stämmen nur gegenüber bestimmten Zuckerarten ausgeprägt. Abgesehen von den Untersuchungen Reiner Müllers beziehen sich die mitgeteilten Mutationserscheinungen meist nur auf einzelne Kulturen. Ferner wurde von allen Autoren stets betont, daß die neugebildete Varietät immer konstant bleibe, und daß Rückschläge überhaupt nicht, oder nur als ganz seltene Ausnahmefälle zu beobachten seien. Diese Annahme erscheint nach meinen Beobachtungen nicht richtig; ich komme auf diesen Punkt später noch zurück.

Nicht speziell um Neuerwerbung einer Zucker vergärenden Eigenschaft handelt es sich bei den weiteren Untersuchungen von Reiner Müller und von Jakobsen. Es liegen hier plötzliche Veränderungen der Koloniebildung vor, wobei die neue Varietät ebenfalls ausgesprochene Konstanz besitzen soll. In etwas anderer Richtung bewegen sich die Mitteilungen von Schottelius (29) über ältere Prodigiosus-Kulturen und von Gruber und Firtsch (30) über den Vibrio Finkler-Prior, bezw. von Kruse (31) bei einem längere Zeit in Brunnenwasser gehaltenen Choleravibrionenstamm. Es ist in diesen Fällen von den Autoren eine Abspaltung in morphologisch differente Abarten von mehr oder minder großer Beständigkeit beobachtet worden.

Die neuerdings beim Abschluß dieser Arbeit von Beijerink (32) berichteten Beobachtungen entsprechen eher den von mir beschriebenen Erscheinungen und bestätigen namentlich meine schon bei der ersten Mitteilung meiner Befunde gemachte Angabe, daß bei diesen Vorgängen gesetzmäßig wieder Rückschläge auftreten. Die Mitteilungen von Beijerink behandeln Mutationsvorgänge bei Bac. prodigiosus, Bac. herbicola und bei Leuchtbakterien, ferner bei Chlorella variegata, Schizosaccharomyces octosporus und bei Saccharomyces. Da meine Ausführungen sich an dieser Stelle zunächst nur mit der Variation, bezw. Mutation bei Bakterien befassen, so möchte ich hier auch nur kurz auf die Stellen in der Arbeit von Beijerink eingehen, welche die Wachstumsvorgänge bei den Bakterien behandeln. Bei Bac. prodigiosus gelang es diesem Forscher, 15 verschiedene Mutationsformen bei einer Kultur, darunter 6 farblose, die übrigen farbstoffbildend, zu isolieren, welche kulturell und auch in ihren sonstigen Eigenschaften, abgesehen von der Differenzierung durch die Farbstoff-, bezw. Schleimbildung, keine weiteren Unterschiede aufwiesen. Bei Bac. herbicola konnte er drei verschiedene Varietäten oder Mutanten aus einem Stamm auf Würzgelatine züchten, die mit den in der Natur vorkommenden Stämmen völlige Übereinstimmung zeigten. In ähnlicher Weise wie bei Prodigiosus wurde von Beijerink bei Bac. phosphoreus und indicus das Auftreten von Mutation beobachtet, wobei sich Mutanten von verschiedener Leuchtkraft und gleicher Konstanz wie die Stammform bildeten. Bei allen Mutationsstämmen der untersuchten Bakterienarten erfolgten unter gewissen Umständen

Rückschläge, also atavistische Vorgänge, indem beim Wiederauftreten der Mutation die Mutanten sprunghaft wieder in die alte Stammform zurückkehrten. Abweichend sind von meinen Untersuchungen die Befunde Beijerinks in der Art, daß bei seinen Beobachtungen nur die Änderung einer Eigenschaft festgestellt wurde. Ich komme darauf später noch zurück.

Die vorstehend beschriebenen eigenartigen Wachstumsvorgänge bei Bakterien wurden von allen Autoren übereinstimmend als Mutationserscheinungen aufgefaßt. Von diesem Standpunkt allein abweichend ist die Stellungnahme von Bernhard (33), der nach dem Vorgang von Reiner Müller u. a. Untersuchungen über die Knopfbildung bei Dysenteriestämmen und Bact. coli mutabile anstellte und ebenfalls diese Erscheinung beobachten konnte. Er spricht aber diese Vorgänge als Modifikation an. Er stellte nämlich fest, daß bei Abimpfung von dem Knopfe einer auf Lackmus-Maltose-Agar blau gewachsenen Dysenteriekolonie die Tochterkeime bei zahllosen Überimpfungen auf Maltose-Agar den Nährboden infolge der scheinbar neu entstandenen Eigenschaft der Maltosevergärung röteten, ohne daß sie selbst wieder Knöpfe zu bilden vermochten. Wurden jedoch Affen mit Material dieser „modifizierten" Kolonien gefüttert, so ließen sich aus dem Darm der kranken Tiere wieder Keime züchten, welche die Maltose zu vergären nicht imstande waren und wiederum Knöpfe bildeten. Ähnlich war das Ergebnis bei einem aus dem Stuhl gezüchteten Stamm von Bact. coli mutabile. Auch hier fand Bernhard bei Kaninchen wie bei Mäusen, die eine frische, von vergärenden Knöpfen stammende Agarkultur teils intravenös teils subkutan erhalten hatten, nach Ausstrichen aus dem Herzblut und den inneren Organen der an Colisepsis eingegangenen Tiere auf dem Lackmus-Laktose-Agar außer roten vergärenden auch eine Anzahl blauer, nicht vergärender Kolonien, die dann aufs neue Knöpfe bildeten. Er zog aus diesen Versuchen den Schluß, daß die erwähnten Wachstumsvorgänge (Knopfbildung), bezw. Bildung einer neuen, gewisse Zuckerarten aufspaltenden Eigenschaft nicht vererbbar seien und nicht als Mutation, sondern als Modifikation gedeutet werden müßten.

Was nun überhaupt den Mutationsbegriff anlangt, so ist nach H. de Vries (34), der zuerst die Bezeichnung in der Literatur gebraucht hat, das Charakteristische dieser Erscheinung die Tatsache, daß eine neue Art mit besonderen Eigenschaften plötzlich ohne bekannte Ursache aus der alten entsteht und ihre neuen Eigenschaften zu vererben imstande ist. Es handelt sich also, wie sich Standfuß ausdrückt, um „explosiv erfolgende Umgestaltungen", die sich Generationen hindurch weiter erhalten. Die neuen, scharf von der alten Art abgrenzbaren, sprunghaft oder ruckweise entstandenen Varietäten hat man deshalb auch als „Sprungvariationen" bezeichnet. Französische Forscher benennen entsprechend die Mutation als „Variation par secousses" d. i. stoßweise Variation im Gegensatz zu der gewöhnlichen, individuellen Variabilität.

Der Mutation stellten H. de Vries u. a. in der Lehre von der Änderung der organischen Typen als die andere Form der Variation die individuelle Variabilität, auch fluktuierende, graduelle oder kontuierliche Variabilität genannt, die „Variation im engeren Sinne", gegenüber. de Vries versteht unter individueller Variabilität eine „Umprägung schon vorhandener Anlagen", „Abweichungen vom Mittel des Typus"

der betreffenden Art. Deshalb kann auch „die gewöhnliche Variabilität . . . nicht zu einem wirklichen Überschreiten der Artgrenzen führen, noch viel weniger zur Entstehung neuer konstanter Merkmale". Die Variabilität entspricht im wesentlichen einer Anpassung an die äußeren Lebensbedingungen und ist direkt und zwar in hohem Grade von den Ernährungsbedingungen abhängig. Sobald daher die besonderen, die individuelle Variabilität bedingenden Einflüsse nicht mehr einwirken können, sondern ausgeschaltet werden, verschwindet sie wieder und ist also im Gegensatz zur Mutation inkonstant.

Individuelle Variabilität ist eine häufige Erscheinung und bei allen Arten vorhanden, während ihr gegenüber Mutation bisher nur selten beobachtet wurde. Als besonders charakteristische Beispiele von großer Variabilität erwähnt de Vries gewisse Mohnarten und den fünfblättrigen Klee, dessen Blätterzahl zwischen 3—7 gewöhnlich variieren kann, ferner Johannsen (35) die Zahl der Strahlen bei den Flossen einer Fischart.

Die gewöhnliche Variabilität spielt natürlich auch bei den Bakterien wegen der Plastizität und Labilität der Mikroorganismen eine große Rolle. Sie ist dabei in hohem Maße abhängig von verschiedenen, äußeren Bedingungen, z. B. von den Ernährungsverhältnissen, der Temperatur, vom Salzgehalt des Nährbodens; sie wird beeinflußt von Desinfizientien oder anderen chemischen Körpern (Arsen) usw. Diese Verhältnisse sind wiederholt eingehend untersucht und in der Literatur besprochen worden (Maaßen, Marx usw.).

An dieser von de Vries gegebenen Einteilung der Veränderungen organisierter Lebewesen, die von ihm unter dem Sammelnamen Variation im älteren Sinne des Wortes zusammengefaßt wurden, haben auch andere Botaniker und Forscher wie z. B. Bauer (36), Johannsen, Beijerink in ihrer jüngsten Darstellung dieser Erscheinungen festgehalten, wenn sie auch einzelne neue Bezeichnungen eingeführt haben. Es sind somit bei der Variation als einzelne Untergruppen nach Bauer zu unterscheiden: 1. „Modifikationen" 2. „Variationen durch Neukombination" oder „Kombinationen" 3. „Mutationen".

Die Modifikationen, welche der individuellen oder fluktuierenden Variabilität von de Vries entsprechen, sind „nicht erbliche Verschiedenheiten zwischen den Individuen einer Sippe, verursacht dadurch, daß allerhand Außeneinwirkungen, Licht, Wärme, Ernährung usw. die einzelnen Individuen ungleich beeinflußt haben".

Die „Kombinationen", welche nur bei den sexuell differenzierten Organismen in Betracht kommen, stellen „erbliche Verschiedenheiten zwischen den Individuen einer Sippe und auch zwischen den Nachkommen eines Elternpaares dar, verursacht durch Bastardspaltung und Neukombination der Erbeinheiten".

Die „Mutationen" bedeuten „erbliche Verschiedenheiten zwischen den Eltern und ihren Nachkommen — auch den vegetativ entstandenen —, welche nicht auf Bastardspaltung beruhen, sondern welche andere Ursachen haben".

Diese drei scharf voneinander getrennten Kategorien der Variation lassen sich unmittelbar nach ihrem Auftreten durch ihr bloßes Aussehen nicht ohne weiteres voneinander unterscheiden. Ihre Differenzierung wird erst ermöglicht durch Heranziehung von genauen Vererbungsversuchen.

Bei der Beurteilung der Variation bei Bakterien fallen nach allgemeiner Auffassung die Kombinationen (Bastardabspaltung) ohne weiteres aus, da diese Erscheinungen, wie aus der obigen Definition hervorgeht, nur bei sexuell sich fortpflanzenden Organismen, insbesondere bei allogamen (getrennt geschlechtlichen), auftreten können. Es kommen somit hier nur die beiden anderen Untergruppen der Variation, nämlich Modifikation und Mutation, in Betracht.

In der Evolutionstheorie spielen noch einige andere Begriffe eine Rolle, und es dürfte daher angezeigt sein, hier kurz auf diese Definitionen, wie sie die neuere Forschung festgelegt hat, nämlich auf Selektion, Adaption und Fluktuation einzugehen.

Wie Johannsen an zahlreichen Versuchen mit Bohnen zeigte, hat die Selektion („Sortierung" oder Auswahl) auf die Vererbung der genotypischen Charaktere (Erbeinheiten) keinerlei Einfluß. Die Selektion wirkt nicht produktiv wie die Vorgänge der Variation, sondern sie „rottet aus, schafft Platz". Auch die Adaption, d. h. Anpassung an bestimmte äußere Einflüsse, ist nach der Auffassung von Bauer nicht erblich konstant. Der genannte Forscher erwähnt dabei ausdrücklich, daß trotz vieler Versuche ein Beweis von erblicher Adaption bisher noch nicht erbracht worden sei. Wohl könne man in der Natur gewisse Beobachtungen, z. B. bei Tiefseefischen machen, welche die Vorstellung einer erblichen Anpassung erweckten; aber „wie" diese Anpassung entstanden sei, die Frage habe niemand gelöst.

Den Begriff der Fluktuation oder fluktuierenden Variation, die von Beijerink und Pringsheim (37) ebenfalls als eine Untergruppe bei den Erscheinungen der Variation beibehalten, bezw. aufgeführt wird, will Bauer bei der Vererbungsfrage ganz ausgeschaltet wissen, da diese Bezeichnung nur einen Namen für zwei Kategorien, nämlich für Modifikation und Kombination, also einen Doppelbegriff darstelle und nur verwirrend wirke. Auch bei den anderen Autoren, z. B. Johannsen, Beijerink, Pringsheim gehen die Anschauungen über dieBedeutung des Begriffes „Fluktuation" auseinander. Beijerink z. B. vertritt den Standpunkt, Fluktuation und Mutation seien nur dem Grade nach verschieden, bei der ersten seien die Sprünge kleiner wie bei der letzten, beide Vorgänge lösten erblich übertragbare Verschiedenheiten bei den Organismen aus, die Fluktuation werde ferner vorwiegend durch äußere Bedingungen herbeigeführt, die Mutation dagegen beruhe hauptsächlich auf inneren Einflüssen, eine scharfe Grenze endlich zwischen beiden Begriffen lasse sich nicht ziehen. Johannsen dagegen betont, daß zwischen den beiden Begriffen eine „haarscharfe" Scheidung möglich sei. Mutation bringe eine Änderung der genotypischen Charaktere (Erbeinheiten) hervor, nicht aber die Fluktuation; auch sei die Mutation im Gegensatz zur Fluktuation erblich. Durch sogenannte Nachwirkungserscheinungen werde bei ungenügender Untersuchung allerdings eine Erblichkeit der Fluktuation vorgetäuscht.

Pringsheim endlich, der im übrigen bei der Fluktuation eine vererbbare und eine nicht vererbbare Form unterschieden wissen will, hat sich gegen eine Anwendung des von der neueren botanischen Forschung darauf ausgedehnten Begriffes der Mutation bei den Mikroorganismen ausgesprochen. Er betont, daß dieser Begriff speziell für die auf sexuellem Wege vererbbaren Variationen gewählt worden sei, ferner, daß

das die Mutation kennzeichnende „sprungweise Auftreten von neuen morphologischen Eigenschaften bei niederen Organismen mit ihrer beschränkten Formenausbildung überhaupt nur schwer aufzufinden sei". Im Gegensatz zu dem genannten Autor wird von anderer Seite, z. B. Bauer, Johannsen nachdrücklich darauf hingewiesen, daß Mutationserscheinungen bei den höher stehenden Organismen, speziell bei den allogamen (getrennt geschlechtlichen) Individuen, im allgemeinen der Beobachtung nur schwer zugänglich seien, daß man häufig nicht genau entscheiden könne, ob echte Mutation oder Kombination (Bastardierung) oder, was noch wahrscheinlicher sei, beide Vorgänge zu gleicher Zeit vorliegen. Bei den asexuellen Mikroben dagegen kommen diese Zweifel im Wegfall durch die Ausschaltung der nur bei den sexuellen Formen sich findenden Kombination. Weiterhin konnte Beijerink durch seine Untersuchungen, die er teils an Bakterien, also an Asexuellen, teils an Hefearten, also niederen sexuellen Mikroben durchgeführt hat, zeigen, daß die Mutation bei diesen verschiedenen Organismen sich in der gleichen Weise vollzieht. Dieser Autor hat auch feststellen können, daß die Mutanten einer Rasse ihre besonderen Erbeinheiten ebenso gut durch vegetative Zellen wie durch Sporen auf ihre Nachkommen übertragen, und hervorgehoben, daß gerade die an und für sich leicht beeinflußbaren Bakterien zur experimentellen Erforschung der Mutationserscheinungen sich weit mehr eignen als die höheren Organismen.

Nach allem dürfte es sich also doch empfehlen, beim Studium der Bakterienvariation die von Bauer, Schinz (39) u. a. vorgeschlagenen und scharf definierten Begriffe der Modifikation und der Mutation als leitende Gesichtspunkte zugrunde zu legen.

Bevor ich jedoch des Näheren auf eine Beurteilung meiner oben mitgeteilten Befunde sowie der anderen als Mutation oder Modifikation angesprochenen Wachstumsvorgänge nach diesen Gesichtspunkten eingehe, möchte ich kurz noch einige Worte über den Mechanismus der Mutation und die sie auslösenden Momente einfügen.

Nach der Vererbungslehre sind als Träger der sichtbaren Eigenschaften nach Bauer, Beijerink u. a. die Genen oder Erbeinheiten anzusprechen, die man sich als Teile des Protoplasmas oder des Zellkerns vorstellen kann. Dieselben zerfallen in aktive Genen, also sichtbare Eigenschaften, und in schlummernde oder Progenen, welche durch die Mutation in aktive, wahrnehmbare Erbeinheiten übergeführt werden können. Die Gesamtsumme der Erbeinheiten einer Zelle umfaßt also sämtliche in einem Organismen enthaltenen erblichen Eigenschaften. Als solche Erbeinheiten sind beispielsweise Gärvermögen gegenüber bestimmten Zuckerarten, Farbstoffbildungsvermögen, Agglutininbildung anzusprechen. Beijerink empfiehlt zum leichteren Verständnis der Vererbungslehre für den Mikrobiologen eine derartige Beziehung der Eigenschaften (Genen) auf konkrete Substanzen, z. B. Farbstoffe. Nach ihm wurde ferner weder bei Mikroben noch bei Tieren und Pflanzen ein Beweis dafür erbracht, daß bei der Mutation wirklich neue Genen gebildet werden; es handelt sich vielmehr stets um eine Aktivierung der in der Stammform bereits in ihrer Anlage vorhandenen Erbeinheiten, also von Progenen.

Was die auslösendenden Ursachen der Mutation betrifft, so können diese Vorgänge nach den bisherigen Erfahrungen teils unter normalen Lebensbedingungen auf-

treten, teils können sie durch besondere äußere Reize z. B. chemische Reize, schwache Giftwirkung, große Hitze, eingreifende Beschädigungen u. a., welche die genotypische Grundlage eines Organismus mehr oder weniger zu erschüttern vermögen, veranlaßt werden.

Bei meinen Untersuchungen, welche sich zunächst mit dem Auftreten der Mutation nach Überimpfung der Bakterien auf die üblichen einfachen, normalen Nährböden beschäftigten, scheint die Hauptursache daher in der plötzlichen Schaffung sehr günstiger Lebensbedingungen zu liegen, die den Bakterien die Möglichkeit zu starker Vermehrung und reichlicher Ernährung der einzelnen Zellen bieten. Als Ausgangsmaterial benutzte ich bei meinen Versuchen stets ältere Agar- oder Bouillonkulturen, die einige Zeit hindurch bei gewöhnlicher oder bei einer Temperatur von 37° gestanden hatten, nachdem also auf den betreffenden Nährmedien die Existenzbedingungen für die einzelnen Bakterien bedeutend ungünstiger geworden waren. Wenn ich nun von einem derartig mehr oder weniger erschöpften Nährboden die Bakterien auf frisch zubereitete, sehr günstige, normale Nährmedien überimpfte, so setzte in den meisten Fällen eine scharf ausgeprägte Mutation ein. Dabei kamen die Differenzen zwischen den verschiedenen Mutanten um so deutlicher zum Vorschein, je stärker der Unterschied zwischen den Lebensbedingungen auf dem alten und denen auf dem neuen Nährmedium war, je älter also mit anderen Worten die Ausgangskulturen waren, und je günstigere Entwicklungsbedingungen das unter den üblichen Nährboden ausgewählte Nährsubstrat bot. So konnte ich z. B. bei den meisten Bakterienarten, darunter Typhus, Cholera, Ruhr usw. auf der gewöhnlichen Agarplatte eine größere Deutlichkeit der Mutationserscheinungen beobachten als auf den sog. Elektivnährböden wie Drigalski-, Malachitgrün-, 3% stark alkalischen Choleraagar, was nach meiner Auffassung dadurch bedingt war, daß die genannten Nährböden den betreffenden Bakterien keine so günstigen Existenzbedingungen gewährten als die gewöhnliche Agarplatte. Bei Kokken erhielt ich die schönsten Mutationsbilder auf gewöhnlichen Blutagarplatten, bei Diphtherie auf Löfflerschen Serumplatten, also wiederum gerade auf den Nährsubstraten, die jeweils einer Bakterienart die besten Lebensbedingungen boten.

Die von mir oben wiederholt hervorgehobene praktisch wichtige Tatsache, daß sich Mutationsvorgänge bei Bakterien unmittelbar bei ihrer Isolierung aus menschlichen Fäces bereits auf den dazu benutzten Nährböden nachweisen ließen, dürfte vielleicht ebenfalls auf einer den Bakterien günstigen Änderung ihrer Lebensbedingungen beruhen. Es spricht meines Erachtens nichts gegen die Auffassung, daß die einzelnen Mikrobenarten, vor allem die pathogenen, im Tierkörper, bezw. in den Fäces infolge des Konkurrenzkampfes mit anderen Arten, der Schädigung durch chemische Körper, insbesondere Abbauprodukte des Nahrungseiweißes, der Verdauungssäfte (Magensaft!), der Antikörperbildung usw. gegenüber den Verhältnissen auf zusagenden, künstlichen Nährmedien wesentlich ungünstigere Existensverhältnisse haben. Dies zeigt sich vielfach in einem raschen Absterben der Bakterien z. B. von Ruhr- oder Cholerabazillen in den Ausleerungen. Diese Verhältnisse weisen also eine Art Parallele zu den Bedingungen auf, unter denen von mir beim Wechsel der Nährböden Mutationsvorgänge bei Bakterien beobachtet wurden.

Mit der obigen Auffassung steht ferner die von mir gemachte Feststellung im Einklang, daß bei Übertragung von Bakterien aus zugeschmolzenen Kulturröhrchen, wo also eine nennenswerte Weiterentwicklung der Keime und eine dadurch bedingte Erschöpfung des Nährbodens nicht erfolgen konnte, auf dem neuen Nährmedium in keinem Fall Mutation auftrat, selbst wenn die benutzten Kulturröhrchen mehrere Jahre gestanden hatten. Bei diesen Untersuchungen verwandte ich z. B. neun Jahre alte Cholerakulturen, acht Jahre alte Diphtheriestämme, sieben Jahre alte B. prodigiosus- und sieben- bezw. sechs Jahre Parathyphus B-Kulturen.

Während nun bei meinen oben besprochenen Untersuchungen die Mutationserscheinungen gerade nach Übertragung der Bakterien in besonders günstige Ernährungsverhältnisse sich einstellten, können weiterhin Mutationsvorgänge auch durch bestimmte äußere Reize ausgelöst werden. Unter solchen, durch äußere Reize hervorgerufenen Mutationserscheinungen bei Bakterien wäre vielleicht die von Jakobsen mitgeteilte Beobachtung nach wiederholter Autoklavierung des Nährbodens, ferner die nur auf bestimmten Nährmedien auftretende, von verschiedenen Autoren beschriebene Knopfbildung anzuführen. Im ersten Fall handelt es sich um ein bei Verwendung eines besonders vorbehandelten Nährmediums plötzlich erfolgendes Auftreten eines neuen erblich konstanten Kolonientyps neben dem alten, als charakteristisch geltenden; bei den zahlreichen Mitteilungen über die Knopfbildung bei verschiedenen Bakterienarten wird durch den Reiz eines besonderen Nährbodens eine neue, erblich fixierte, fermentative Eigenschaft plötzlich geschaffen. Die Frage, ob auch diese Erscheinungen als echte Mutation aufzufassen sind, dürfte also wohl zu bejahen sein. Derartige, auf äußeren Reizen beruhende Mutationserscheinungen wurden auch bei anderen Mikroorganismen und bei höheren Lebenstypen beobachtet, die indirekt einen Vergleich uns gestatten. So ist es z. B. Hansen (41) bei Hefepilzen durch Kultivierung bei hoher Temperatur während einiger Zeit gelungen, aus normalerweise sporenbildenden Rassen einen neuen Typ zu isolieren, welcher dauernd bei einer auf sehr viele Generationen sich erstreckenden Prüfung das Sporenbildungsvermögen verloren hatte. Dabei sei erwähnt, daß Hansen bei seinen Untersuchungen von Einzellkulturen ausgegangen ist, so daß es sich also hier nicht um Isolierung eines bereits in der Kultur vielleicht vorhandenen Typs, sondern um Schaffung einer neuen, erblich konstanten Art und zwar unter Verlust von einer Gene (Erbeinheit), nämlich der Sporenbildung, handelt.

Aber auch bei höher stehenden Organismen, z. B. Pflanzen, wurde Mutation infolge äußerer Reize ausgelöst. So hat z. B. Mac Dougal (42) durch Einspritzen von verschiedenen Salzlösungen in den Hohlraum der Fruchtknoten bei Oenothera (Nachtkerze) und Raimannia odorata, ferner durch Behandlung dieser Organe mit Radium usw. vereinzelt bei Individuen das Auftreten neuer Lebenstypen beobachtet. Blaringhem (40) kommt auf Grund seiner Verwundungsversuche mit Maisrassen zu der Auffassung, daß „die eingreifenden Verstümmelungen ein allgemeines und bequemes Mittel sind, Mutationserscheinungen hervorzurufen bei Pflanzenrassen (lignées), welche bisher ganz konstant waren".

Durch Einwirkung außergewöhnlicher Temperaturen und zwar sowohl durch Hitze wie durch Kälte bei Puppen verschiedener Schmetterlinge vermochten Fischer,

Standfuß (39) u. a. interessante Farbenvariationen bei den entsprechenden Schmetterlingen hervorzurufen. Diese Variationen, „Aberrationen“ vom gewöhnlichen Typ, waren zum Teil erblich und sind demnach teils Mutationen, soweit sie erblich fixiert sind, also eine direkte Beeinflussung der genotypischen Grundlage (Erbeinheiten) erkennen lassen, teils als Modifikation mit nicht erblichem Charakter aufzufassen. Auf dem gleichen Wege hat Tower (38) bei einer Käferart, Leptotarsa decemlineata durch sehr interessante von anderen Forschern bestätigte Versuche Mutationsvorgänge künstlich auslösen können. Er ging bei seinen Untersuchungen von der Tatsache aus, daß die Weibchen dieser Käfer ihre Eier nicht auf einmal, sondern in mehreren, durch längere Zwischenpausen (jeweils etwa eine Woche) getrennten Portionen legen, und setzte vier Käferpaare während der Entwicklung ihrer ersten (drei) Eierportionen Lebensbedingungen von großer Wärme (35° C), großer Trockenheit (45 % Sättigung) und niederem Luftdruck (20 inches) aus. Sodann wurden sämtliche Käfer wieder unter normale Existenzverhältnisse gebracht, und es erfolgten dann zwei weitere Eierablagen. Sämtliche während der beiden Versuchsabschnitte produzierten Eier wurden unter normalen, also gleichen Bedingungen ausgebrütet. Dabei entwickelten sich aus den Eiern, die unter normalen Verhältnissen gebildet worden waren, ausschließlich typische Käfer wie die Stammform der L. decemlineata, welche auch bei weiterer Fortpflanzung sich konstant erwiesen. Aus den Eiern der sogenannten „Hitzeportionen“ aber gingen unter 96 Käfern nur 14 normale, dagegen 82 der Varietät pallida mit abweichend bleicher Färbung und 2 Tiere von der Mutationsform L. d. immaculothorax (fehlende Flecke am Thorax) hervor. Leider gingen fast alle Mutenten der beiden letztgenannten Typen durch Bakterieninfektion zugrunde, und es blieben nur 2 pallida-Männchen am Leben. Durch interessante Bastardierungsversuche (Kreuzung) der überlebenden Rassen erbrachte nun Tower den Beweis für die Konstanz seiner Varietäten. Als er nämlich die pallida-Männchen mit typischen decemlineata-Weibchen kreuzte, erhielt er Bastarde vom Aussehen der decemlineata, aus diesen Bastarden aber gingen nach gegenseitiger Paarung 10 typische pallida- und 30 decemlineata-Käfer hervor. Die neu entstandene pallida-Varietät erwies sich dann bei Inzucht ebenso wie die decemlineata-Rasse als konstant.

Aus den letztgenannten Beispielen, die eine gewisse Parallele zu den bei den Bakterien durch äußere Reize ausgelösten Mutationserscheinungen besitzen, geht auch hervor, wie wenig es sich empfehlen dürfte, nach dem Vorschlag von Pringsheim nur für sexuell sich fortpflanzende Organismen den Mutationsbegriff zu verwenden, und die bei den Asexuellen auftretenden, entsprechenden Vorgänge als Fluktuation zu benennen.

Wie läßt sich nun mit der Mutation, bezw. dem Erblichkeitsfaktor derselben die Tatsache in Einklang bringen, daß ich geradezu gesetzmäßig bei den isolierten Mutationsstämmen aufs neue die Mutationserscheinungen oder vielmehr entsprechende Rückschläge beobachten konnte, nämlich dann, wenn die gleichen Bedingungen wie beim ersten Auftreten der Mutation gegeben sind, wenn also aus älteren, mit den getrennten Varietäten beimpften Agarröhrchen oder älteren Bouillonkulturen usw. Ausstriche auf frischen, günstigen Nährböden angelegt wurden? Das Auftreten dieser

sogenannten Rückschläge bedeutet indessen keinen Widerspruch und steht durchaus im Einklang mit dem bereits von de Vries festgelegten Mutationsbegriff. Daß dieselbe Mutation, derselbe Sprung sich wiederholen kann, vorausgesetzt, daß die auslösende Ursache vorhanden bleibt, wurde bereits von dem genannten Autor betont. Ebenso hat er auch, wiewohl selten, Rückschläge zu der alten Form beobachtet. Diese Rückschläge, die auch als Atavismus bezeichnet werden, vollziehen sich, wie m. E. eindeutig aus meinen Untersuchungen hervorgeht, bei den Bakterien regelmäßig und zwar anscheinend unter den gleichen Bedingungen und in derselben Weise wie die Mutation. Es handelt sich genau um dieselben Vorgänge wie bei der Mutation. Nehmen wir z. B. bei Cholera an, die Bakterien der hellen, durchscheinenden Kolonieform seien die ursprüngliche Art gewesen, die in gelbweißen, trüben Kolonien wachsenden seien die neue Mutationsform, so sehen wir, daß die neugebildete Varietät unter den gleichen Bedingungen, unter denen sie selbst entstanden ist, „ataviert" und dabei direkt wieder Bakterien mit Kolonieformen, nämlich Vibrionen in hellen, durchscheinenden Kolonien, wie die ursprüngliche Stammform abspaltet. Man kann indessen nicht entscheiden, welche der verschiedenen Mutationsarten die von Anfang gegebene, natürliche war, und es geht daraus hervor, daß Mutation und Atavismus gleichartige Vorgänge sind, und daß man in vielen Fällen, bei den Bakterien sogar wohl regelmäßig, nicht unterscheiden kann, ob Mutation oder Atavismus vorliegt. Es handelt sich bei beiden Erscheinungen nach der Genentheorie um eine Verwandlung von Progenen (schlummernden Erbeinheiten) in aktive Genen oder Erbeinheiten oder umgekehrt um eine Überführung von Genen in Progenen. Auch Beijerink kommt auf Grund seiner Beobachtungen zu dem Schluß, daß Mutation und Atavismus kongruente und gleichwertige Vorgänge sind, und daß eine Entscheidung, welche von den beiden Formen in einem Falle jeweils aufgetreten ist, meist schwierig ist.

Die isolierten Varietäten der einzelnen Bakterienarten atavieren, wie aus meinen Untersuchungen hervorgeht, nicht gleichmäßig leicht. Die helle wie die perlmutterartig glänzende Kolonienart bei Bac. enterid. Gaertner zeigen Rückschläge schon nach sehr kurzer Frist im Gegensatz zu Typhus und Paratyphus, bei denen ohne weitere Überimpfung die isolierten Mutationsstämme sich mehrere Monate ganz charakteristisch erhalten, oder zu den Dysenteriebazillen, wo Atavismus meist erst unter Verhältnissen, unter denen die Mutationsstämme auf künstlichen Nährmedien bereits im Absterben begriffen sind, beobachtet werden kann.

Stehen nun meine Beobachtungen über ein anscheinend gesetzmäßiges Auftreten von Atavismus bei Mutanten nicht in einem gewissen Gegensatz zu den von anderer Seite bezgl. der Mutation bei Bakterien mitgeteilten Tatsachen, insbesondere zu den künstlich durch äußere Reize hervorgerufenen Mutationen, da hier wenigstens, soweit aus der Literatur ersichtlich ist, ausdrücklich behauptet wurde, Rückschläge seien im allgemeinen nicht aufgetreten? Nur Beijerink, der einen dem meinen ähnlichen Standpunkt einnimmt, hat in gesetzmäßiger Weise erfolgende Rückschläge beobachtet. Ein derartiger Gegensatz besteht jedoch den vorstehend erwähnten Beobachtungen gegenüber nicht. Ich hatte von vorneherein auf Grund meiner Beobachtungen auch für diese Fälle ein gesetzmäßigeres Auftreten von atavistischen

Erscheinungen angenommen und bei meinen nach dieser Richtung hin ausgeführten Untersuchungen diese Auffassung auch bestätigt gefunden. Wenn von anderen Autoren derartige Feststellungen nicht gemacht wurden, so liegt dies vermutlich daran, daß systematische Untersuchungen in dieser Form nicht ausgeführt wurden, oder daß die genannten Vorgänge wie z. B. von Bernhardt zwar beobachtet, aber in anderem Sinne gedeutet wurden! Bernhardt hat, wie oben ausgeführt, aus dem Umstand, daß er z. B. bei Bact. coli mutabile aus dem Herzblut von Tieren, die mit frischer, von Laktose vergärenden Knopfkolonien angelegter Agarkultur intravenös oder intraperitoneal geimpft und an Colisepsis dann eingegangen waren, wieder rote, vergärende und außerdem noch blaue, nicht vergärende Kolonien, mit der knopfbildenden Fähigkeit züchten konnte, den Schluß gezogen, es liege bei der von Neisser und Massini sowie anderen Autoren berichteten, als Mutation aufgefaßten plötzlichen Änderung des Zuckerspaltungsvermögens bei dem genannten Bact. coli-Stamm nur Modifikation, nicht Mutation vor. Diese Auffassung ist nicht richtig. Wenn es sich hier lediglich um eine Modifikation handeln würde, so hätten sich aus dem Herzblut der verendeten Tiere stets nur die in der einen, nämlich der blauen Kolonienform wachsenden Bakterien isolieren lassen müssen. Statt dessen finden wir aber beide Kolonienarten und zwar neben den als Ausgangsmaterial dienenden auf der Drigalski-Platte rotwachsenden Kolonien noch die andere, auf dem genannten Nährboden blaue Scheiben bildende Varietät. Es liegt also nicht ein Verschwinden einer „modifizierten" Art unter „natürlichen" (Tierkörper) Bedingungen vor, sondern wir haben dieselben Verhältnisse, wie wir sie vorher regelmäßig als sogen. Rückschläge d. h. als typische, der Mutation kongruente, atavistische Wachstumsvorgänge auch auf den gewöhnlichen Nährböden beobachten konnten, die hier durch das gleichzeitige Auftreten der beiden Mutanten auf den zur Isolierung verwendeten Platten charakterisiert sind.

Daß dabei keineswegs die „natürlichen" Verhältnisse im Tierkörper eine außergewöhnliche Rolle spielen, wie Bernhard annimmt, habe ich auf Grund systematischer Untersuchungen über die Knopfbildung bei Bact. coli, über die noch besonders berichtet werden wird, feststellen können. Ich hatte mir unter anderen auch bei einer der von mir isolierten, zahlreichen Bact. coli mutabile-Kulturen durch Abimpfung aus älteren Agarröhrchen auf der Agarplatte die beiden bei dem Abschnitt über Bact. coli beschriebenen Mutationsstämme isoliert, von denen der eine in zarten, hellen, durchscheinenden, der andere in saftigen, gelbweißen Kolonien auf dem genannten Nährboden wuchs. Als ich die beiden getrennten Varietäten auf den Lackmus-Laktose-Agar überimpfte, entwickelten sich auf den blaugewachsenen Scheibchen der beiden Mutationsstämme vom dritten Tag an weißliche Knöpfe, die bei der Fortzüchtung auf dem Drigalskischen Nährboden die Laktose regelmäßig aufspalteten und die Blauplatte röteten. Besonders hervorheben möchte ich die Tatsache, daß die beiden Tochterkolonien im übrigen die spezifischen Eigenschaften der Mutterkolonien aufrecht erhielten. Die aus den Knöpfen des hellen Mutationsstammes gewonnenen Tochterkolonien wuchsen also auf Agar ebenfalls in Form von zarten, hellen, durchscheinenden Scheiben und bestanden aus mittellangen, schlanken Stäbchen, die aus den Knöpfen der trüben Varietät isolierten Tochter-

kolonien bildeten dagegen saftige, undurchsichtige, gelbweiße Agarkolonien und setzten sich aus kurzen, dicken, plumpen Bazillen zusammen. Als eine neue, erblich konstante Eigenschaft war also bei den Bakterien der aus den Knöpfen gewonnenen Tochterkolonien zum Unterschied von denen der Mutterkolonien noch die Fähigkeit der Laktoseaufspaltung hinzugekommen. Ich legte mir nun von den Tochterstämmen der beiden Varietäten der obigen Kultur, nachdem ich in zahlreichen Passagen über Drigalski-, bezw. Endo-Agarplatten die in roten Kolonien wachsenden Bakterien der Knöpfe fortgezüchtet hatte, um die Möglichkeit einer Beimischung von blauwachsenden Keimen (Mutterkolonien) auszuschalten, Agarröhrchen an und impfte aus diesen Tag für Tag mit reichlichem Material auf eine Anzahl Lackmus-Laktose-Agarplatten über, um festzustellen, wann entsprechend unserer Annahme bei diesen isolierten Varietäten Mutation von neuem einsetzen, bezw. der atavistische Rückschlag auftreten würde. Bereits nach fünftägigem Stehen der Agarröhrchen konnte ich nach der Überimpfung auf einzelnen der benützten Blauplatten die erwarteten Wachstumsvorgänge beobachten: es entwickelten sich auf dem genannten Nährboden überwiegend rote Kolonien und daneben eine Anzahl blauer, die bei der Fortzüchung wieder Knöpfe bildeten. Dieselben Rückschläge aus den rotwachsenden Varietäten der beiden ursprünglichen, auf der Drigalskiplatte blaue Kolonien bildenden Mutationsstämme meiner Kultur erhielt ich dann regelmäßig auch bei späteren Abimpfungen z. B. nach 10 oder 20 Tagen aus den genannten Agarröhrchen.

Um nun festzustellen, ob das Laktosevergärungsvermögen der beiden Tochterkolonienstämme auch bei Fortzüchtung dieser Kulturen auf anderen, insbesondere zuckerfreien Nährmedien sich konstant erhält, oder ob es an das Wachstum dieser Stämme auf laktosehaltigen Nährsubstraten wie z. B. Endolaktose-Agar oder Lackmus-Laktose-Agar gebunden ist, impfte ich jeden Tag die genannten Kulturen auf frischen, gewöhnlichen Agarplatten weiter, legte aber zugleich von jeder neuen 24stündigen Agarkultur Kontrollplatten auf Drigalskiagar an. Es ergab sich dabei, daß trotz wochenlanger, ausschließlicher Agarpassagen die beiden Laktose aufspaltenden Tochterstämme ihre neu erworbene, zuckervergärende Eigenschaft unvermindert beibehielten und nach jeder Überimpfung auf die Kontrollplatten den Lackmus-Laktose-Agar nach Art der Bact. coli-Kulturen kräftig röteten.

Endlich injizierte ich weißen Mäusen intraperitoneal je eine Öse der beiden auf der Drigalskiplatte blauwachsenden Mutterkolonien und der beiden entsprechenden, aus den Knöpfen gewonnenen, Laktose vergärenden Tochterstämme. Von drei innerhalb 28 Stunden an Colisepsis eingegangenen Tieren erhielt ich auf einer größeren Serie von Lackmus-Laktose-Agarplatten bei Ausstrichen aus dem Herzblut stets nur die Kolonien der als Ausgangsmaterial verwendeten Stämme, bei der blauwachsenden, trüben Varietät allerdings bereits knopfbildende Kolonien. Diese Beobachtung zeigte, daß im Tierkörper unter Umständen das Eintreten der Mutation begünstigt wird. Ich komme darauf noch zurück und möchte hier zunächst nur erwähnen, daß sonst auf dem genannten Nährboden aus dem Blut der mit den beiden Laktose vergärenden Varietäten geimpften Mäuse nur rot wachsende Bakterien sich wieder herauszüchten ließen, die, wie gleichzeitig angelegte Agarkontrollplatten zeigten, auch ihre sonstigen

charakteristischen Unterschiede hinsichtlich Kolonienbildung wie bezüglich ihrer morphologischen Differenzen unverändert beibehalten hatten. Auch bei Ausstrichen aus dem Herzblut der dritten, innerhalb 24 Stunden verendeten Maus, die mit dem auf der Blauplatte unter Knopfbildung blau wachsenden, auf Agar trübe, gelblichweiße Kolonien bildenden Stamm geimpft worden war, hatte ich, wie schon hervorgehoben, auf dem Lackmus-Laktose-Agar ausschließlich blaue, saftige Scheibchen erhalten, die aber, wie erwähnt, auffallenderweise verschiedentlich deutliche Knopfbildung erkennen ließen. Dieser Umstand, daß hier eine blauwachsende Varietät des Bact. coli mutabile-Stammes nach einer Tierpassage bereits innerhalb 24 Stunden die bekannte Knopfbildung, also Mutationsvorgänge in unmittelbarem Anschluß an die Isolierung aus dem Tierkörper und zwar aus dem Blut aufwies, erscheint mir deshalb besonders beachtenswert, weil sonst auf dem künstlichen Nährboden die erwähnte Knopfbildung erst vom dritten Tag ab zu beobachten ist. Diese Erscheinung bildet in gewisser Hinsicht eine Parallele zu der von mir oben verschiedentlich hervorgehobenen Tatsache, daß bei der Züchtung von pathogenen und apathogenen Bakterien aus dem menschlichem Darm sich häufig bereits auf den zur Isolierung dienenden Nährböden Mutationsvorgänge beobachten ließen. Sie ist anderseits ein weiterer Beweis für die von mir geäußerte Anschauung, daß auch der menschliche, bezw. tierische Organismus die Bedingungen zum Auftreten der Mutation, bezw. des Atavismus schaffen kann. Wahrscheinlich liegt in diesen Beobachtungen auch die Erklärung, warum Bernhardt zu einem abweichenden Resultat kam. Möglicherweise hat Bernhardt bei seinen Untersuchungen Kulturen, die von bereits atavierenden Stämmen abgeimpft waren, benutzt, oder seine Tiere sind erst an der Sepsis nach einer Zeit eingegangen, während der bereits infolge des längeren Verweilens im Tierkörper die Bedingungen zum Auftreten atavistischer Rückschläge, ähnlich wie in meinem Fall bei der dritten mit der trüben, blauwachsenden Varietät des Coli mutabile geimpften Maus zum Auslösen der Mutation, gegeben waren.

Daß verschiedenartige Einflüsse dieselben Mutations-, bezw. Atavismuserscheinungen hervorrufen können, geht aus meinen Untersuchungen hervor. Nicht nur auf den verschiedensten Nährmedien wie Agar, Bouillon, Hammelblutkörperchenaufschwemmung, Lackmusmolke, Löfflersche Malachitgrünlösungen usw. können sich mutationauslösende Einflüsse geltend machen, sondern auch im Tierkörper kommen die Bakterien anscheinend unter Ernährungs- und Lebensbedingungen, welche das Eintreten der Mutation begünstigen. Dies beweisen die von mir oben mitgeteilten zahlreichen Fälle, wo bei pathogenen und apathogenen Bakterienarten unmittelbar auf den ersten zur Isolierung dienenden Nährböden bereits Mutationserscheinungen von mir beobachtet wurden. Einen interessanten weiteren Beitrag dafür bringt eine von Gildemeister bei einer der Bact. coli-Gruppe kulturell nahestehenden, stark schleimbildenden Kapselbakterienart wiederholt gemachte Feststellung. Während bei meinen mit Mutationsstämmen von stark pathogenen Bakterienarten durchgeführten Virulenzprüfungen sich die verschiedenen Varietäten einer Kultur auch bei wiederholter Tierpassage durchweg konstant erwiesen, und niemals Mutation, bezw. Atavismus auftrat, beobachtete Gildemeister gelegentlich der Virulenzprüfung von Mutationsstämmen

der erwähnten Bakterienart, daß nach Impfung aus dem Herzblut derjenigen Tiere, welche die geringste Dosis von Bakterien der trüben Varietät erhalten hatten und die anderen Tiere um 1—2 Tage überlebten, auf der Agarplatte ein Rückschlag der Mutation sich zeigte. Es wuchsen auf diesem Nährboden neben überwiegend trüben, weißlichen noch vereinzelte helle, durchscheinende, schleimige Kolonien; bei einer Anzahl anderer Tiere, die mit der gleichen Varietät intraperitoneal gespritzt, aber wegen höheren Kulturdosen viel früher eingegangen waren, sowie bei den mit Bakterien der hellen Varietät geimpften Tieren wurden aus dem Herzblut nur Kolonien des Ausgangsmaterials, also entweder trübe, undurchsichtige oder helle, durchscheinende Kolonien gezüchtet. Diese Erscheinung erklärt sich wohl daraus, daß die Bakterien bei dem langsameren Verlauf der Infektion während des längeren Aufenthaltes im Tierkörper Bedingungen ausgesetzt waren, unter denen die Mutation, bezw. der atavistische Rückschlag erfolgen konnte. Es gelang also auch hier, eine genaue Übereinstimmung mit meinen Befunden zu erzielen und einen gesetzmäßig erfolgenden Rückschlag (Atavismus) zu erzielen. Wir sehen ferner wiederum ausgeprägte zeitliche Differenzen im Auftreten von Mutation, bezw. Atavismus, je nachdem die Kulturen auf zusagenden künstlichen Nährböden z. B. Agar oder im Tierkörper gehalten wurden.

Zum Schlusse möchte ich noch auf einen weiteren Punkt hinweisen, in dem die von mir berichteten Mutationserscheinungen von den übrigen abweichen. Fast bei allen anderen, oben aufgeführten Mutationsvorgängen liegen sogenannte kleine Mutationssprünge vor, indem, vom Standpunkt der Genentheorie aus betrachtet, jeweils nur 1 Gene oder Erbeinheit sich plötzlich verändert und zwar entweder neu auftritt oder verschwindet, z. B. bei Bact. coli mutabile die fermentative Eigenschaft gegenüber einer Zuckerart oder bei den mutierenden Paratyphusstämmen von Reiner Müller Schleimwallbildung oder bei den mutierenden Bac. prodigiosus-Kulturen von Beijerink die Farbstoffbildung. Beijerink hat bei der Besprechung der Mutation bei Bac. prodigios. ausdrücklich auf die Tatsache hingewiesen, daß sich die Mutanten von der Stammform offenbar nur in einem einzigen Merkmal, also durch eine einzige Erbeinheit, unterscheiden. Bei den von mir mitgeteilten Beobachtungen handelt es sich dagegen stets um eine Anzahl von veränderten Genen beim Auftreten der Abspaltungsvorgänge, es kommen also weit größere Sprünge der Mutation zustande. Wir finden nämlich bei allen Bakterienarten zwischen den differenten Mutationsstämmen

1. Unterschiede in der Koloniebildung,
2. Unterschiede in der morphologischen Beschaffenheit der Bakteriengruppen.

Ferner

3. meist noch Abweichungen zwischen den Mutanten auf kulturellem oder serologischem Gebiet. Hierher gehört z. B. die Differenz in bezug auf das Hämolysierungsvermögen bei den Mutationsstämmen der Cholerakulturen und die eigenartigen, weitgehenden agglutinatorischen Unterschiede bei den Varietäten der mutierenden Gaertner-, Dysenterie- und Bact. coli-Stämme.

Zusammenfassung.

Zusammengefaßt ergibt sich sonach aus den bisher vorliegenden Untersuchungen:

1. Bei allen Bakterienarten lassen sich und zwar anscheinend in gesetzmäßiger Weise bei der Züchtung auf gewöhnlichen Nährböden Mutationsvorgänge beobachten, welche dann in Erscheinung treten, wenn längere Zeit hindurch auf einem künstlichen Nährboden ohne Zwischenimpfung gehaltene Bakterien auf frische Nährsubstrate überimpft werden. Diese Erscheinungen treten sprunghaft auf. Die neu enstandenen Varietäten besitzen ausgesprochene, erbliche Konstanz. Die Zeit, welche nötig ist, um die Mutation auslösenden Vorbedingungen zu schaffen, ist bei den einzelnen Bakteriengruppen und je nach dem Nährboden, auf dem die Mikroben gehalten wurden, verschieden.

2. Die isolierten Mutationsstämme unterscheiden sich in diesen Fällen nicht nur durch eine, sondern durch mehrere neue Eigenschaften und zwar:

a) durch morphologische Veränderungen der Bakterien,

b) durch die Bildung verschiedenartiger Kolonieformen,

c) zum Teil sowohl durch Abweichungen in ihrem kulturellen wie auch in ihrem serologischen Verhalten.

3. Die Mutation erfolgt bei den meisten Bakterienarten nicht immer gleichmäßig in der Art, daß stets nur ein bestimmter Mutationstyp sich ausbildet, sondern wir sehen z. B. bei Typhus, Paratyphus und Ruhr mehrere verschiedene Mutationsgruppen auftreten.

4. Die Mutationserscheinungen bei Bakterien können nicht nur auf künstlichen Nährböden, sondern auch im Tierkörper ausgelöst werden.

5. Bei allen Bakterienarten kommt es bei den isolierten Mutanten, wenn dieselben wieder ähnlichen Existenzbedingungen ausgesetzt sind, unter denen die Mutation erfolgte, anscheinend regelmäßig wieder zu atavistischen Rückschlägen. Diese entsprechen ihrem Wesen nach den Mutationsvorgängen und erfolgen im allgemeinen unter gleichen Bedingungen, nur stellen sie einen Sprung nach rückwärts und zwar in gleichem Umfange dar. In den meisten Fällen ist es deshalb beim Auftreten der genannten Wachstumsvorgänge nicht zu entscheiden, ob Mutation oder ein atavistischer Rückschlag vorliegt.

6. Bei den früher z. B. bei Bact. coli mutabile beschriebenen, als Mutation bezeichneten Beobachtungen handelt es sich ebenfalls um Mutationsvorgänge, die durch besondere und zwar jeweils bestimmte, äußere Reize wie z. B. Autoklavierung des Nährbodens, Zusatz von Zuckerarten zu denselben ausgelöst werden. Bei diesen Mutationserscheinungen liegt in der Regel nur der Erwerb oder Verlust einer neuen Eigenschaft z. B. Zuckervergärungsvermögen vor.

7. Auch hier werden in gleicher Weise wie bei den von mir beobachteten Mutationserscheinungen anscheinend regelmäßig wieder Rückschläge beobachtet.

8. Bei einzelnen isoliert fortgezüchteten Mutationsstämmen können z. B. bei Bact. coli mutabile durch bestimmte, äußere Reize weitere Mutationsvorgänge ausgelöst werden, die noch zum Erwerb einer weiteren, neuen Eigenschaft wie z. B. des Zucker-

vergärungsvermögens bei den sonst unveränderten Varietäten führen. Erfolgen bei diesen gewissermaßen durch sekundäre Mutation noch weiter differenzierten Mutanten atavistische Rückschläge, so wird von den Varietäten zunächst nur der bei der zweiten Mutation vollzogene Sprung wieder zurückgelegt, und die atavistische Entwicklung führt stets nur zu dem als Ausgangsform für die spätere Mutation dienenden Mutationsstamm zurück.

9. Die Mutationsvorgänge sind in verschiedener Hinsicht von praktischer Bedeutung. Da mit ihrem Auftreten im Tierkörper zu rechnen ist, muß bei der Isolierung pathogener Bakterien aus dem menschlichen oder tierischen Organismus die Möglichkeit des Auftretens von Mutationsformen schon bei den ersten Plattenausstrichen berücksichtigt werden. Endlich erscheint es, da die Mutanten bei manchen Bakterienarten in serologischer Hinsicht ein erheblich verschiedenes Verhalten zeigen, nicht ausgeschlossen, daß diesen Vorgängen vielleicht auch bei dem Verlauf der Infektion unter Umständen eine gewisse Bedeutung zukommen kann.

Berlin-Lichterfelde W., Mai 1912.

Literatur.

1. Baerthlein, Berliner Klin. Wochenschr. 1911, Nr. 9; 1911, Nr. 31; 1912, Nr. 4; 1912, Nr. 16.
2. Gaffky, Klin. Jahrbuch 1907, Bd. 16.
3. Kolle, Klin. Jahrbuch 1903, Bd. 11.
4. Friedrich, Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. 8.
5. Kruse, Zeitschr. f. Hygiene Bd. 17.
6. Burri, Das Tuscheverfahren. Jena 1909, G. Fischer.
7. Haendel und Woithe, Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. 34.
8. Baerthlein, Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. 36, Heft 4.
9. Neufeld und Haendel, Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. 26.
10. Kraus, Hammerschmidt und Zecki, Zentralbl. f. Bakteriol., I. Abteil., Originale, Bd. 60, 1911.
11. Kraus und Ruß, Zentralbl. f. Bakteriol., I. Abteil., Originale, Bd. 43, 1907.
12. Haendel und Gildemeister, Zeitschr. f. Immunitätsforschung, 1911, Bd. 11.
13. Lentz, zitiert aus Kolle und Wassermann, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen.
14. Berghaus, Hygien. Rundschau, 1905, Nr. 15.
15. Döberth, Archiv f. Hygiene, 1905, Bd. 52.
16. Trommsdorff, Münch. mediz. Wochenschr. 1905, Nr. 35.
17. Klimenko, Zentralbl. f. Bakteriol., Origin. Bd. 43.
18. Neisser und Massini, Zentralbl. f. Bakteriol., I. Abt. Referate, Bd. 38.
19. Reiner Müller, Münch. mediz. Wochenschr. 1909, S. 885.
20. Derselbe, Zentralbl. f. Bakteriol., I. Abteil. Referate, Bd. 42.
21. Kowalenko, Zeitschr. f. Hygiene, 1910, Bd. 66.
22. Burri und Düggeli, Zentralbl. f. Bakteriol., I. Abteil., Originale, Bd. 49.
23. Hübener, Zentralbl. f. Bakteriol., I. Abteil., Referate, Bd. 44.
24. Reiner Müller, Deutsch. mediz. Wochenschr., 1910, S. 2387.
25. Sobernheim und Seligmann, Zentralbl. f. Bakteriol., I. Abteil., Referate, Bd. 50.
26. Reiner Müller, Zentralbl. f. Bakteriol., I. Abteil., Referate, Bd. 50.
27. Seiffert, Zeitschr. f. Hygiene, 1912, Bd. 71.
28. Jakobsen, Zentralbl. f. Bakteriol., I. Abteil., Originale Bd. 57.
29. Schottelius, Zentralbl. f. Bakteriol., I. Abteil., Referate Bd. 38. 1906.

30. Gruber und Firtsch, Archiv f. Hygiene, Bd. 8.

31. Kruse, Lehrbuch über allgemeine Mikrobiologie 1910.

32. Beijerink, Folia microbiologica, Holländische Beiträge zur gesamten Mikrobiol. 1912. Jahrgang Nr. 1.

33. Bernhardt, Berl. Klinische Wochenschr. 1912, Nr. 15.

34. de Vries, Die Mutationstheorie. 2 Bände. Leipzig 1901—1903. Veit & Co.

35. Johannsen, Elemente der exakten Erblichkeitslehre, Jena, Fischer. 1909.

36. Bauer, Einführung in die experimentelle Vererbungslehre. Berlin 1911.

37. Pringsheim, Variabilität niederer Organismen. Berlin 1910.

38. Tower, An Investigation of Evolution in Chrysomelid Beetles of the Genus Leptinotarsa. Carnegie Institution of Washington. Publ. Nr. 48. 1906.

39. Standfuß, Über die Gründe der Variation und Aberration des Falterstadiums bei Schmetterlingen. Insektenbörse Nr. 11, 1894.

39a. Derselbe, Weitere Mitteilungen über den Einfluß extremer Temperaturen auf Schmetterlingspuppen. Entomolog. Zeitschr. 1895.

40. Blaringhem, Recherches sur les hybrides d'Orges. Compt. rend. Ac. Sc. Paris Nr. 146. 1908.

41. Hansen, Oberhefe und Unterhefe. Studien über Variation und Erblichkeit. Zentralbl. f. Bakteriol., II. Abteil. Originale Bd. 15, 1905 u. Bd. 18, 1907.

42. Mac Dougal, D. T., Vail, A. M. and Shull, G. H., Mutations variations and relationships of the Oenotheras. Carnegie Institution of Washington. Publ. Nr. 81. 1907.

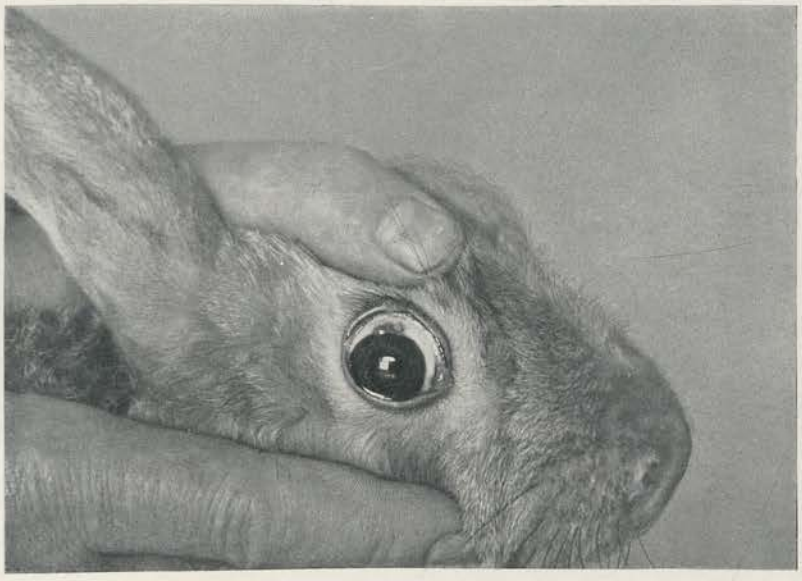
Ende des 4. Heftes.

Abgeschlossen am 22. August 1912.

Druck von E. Buchbinder in Neuruppin.

1.

2.

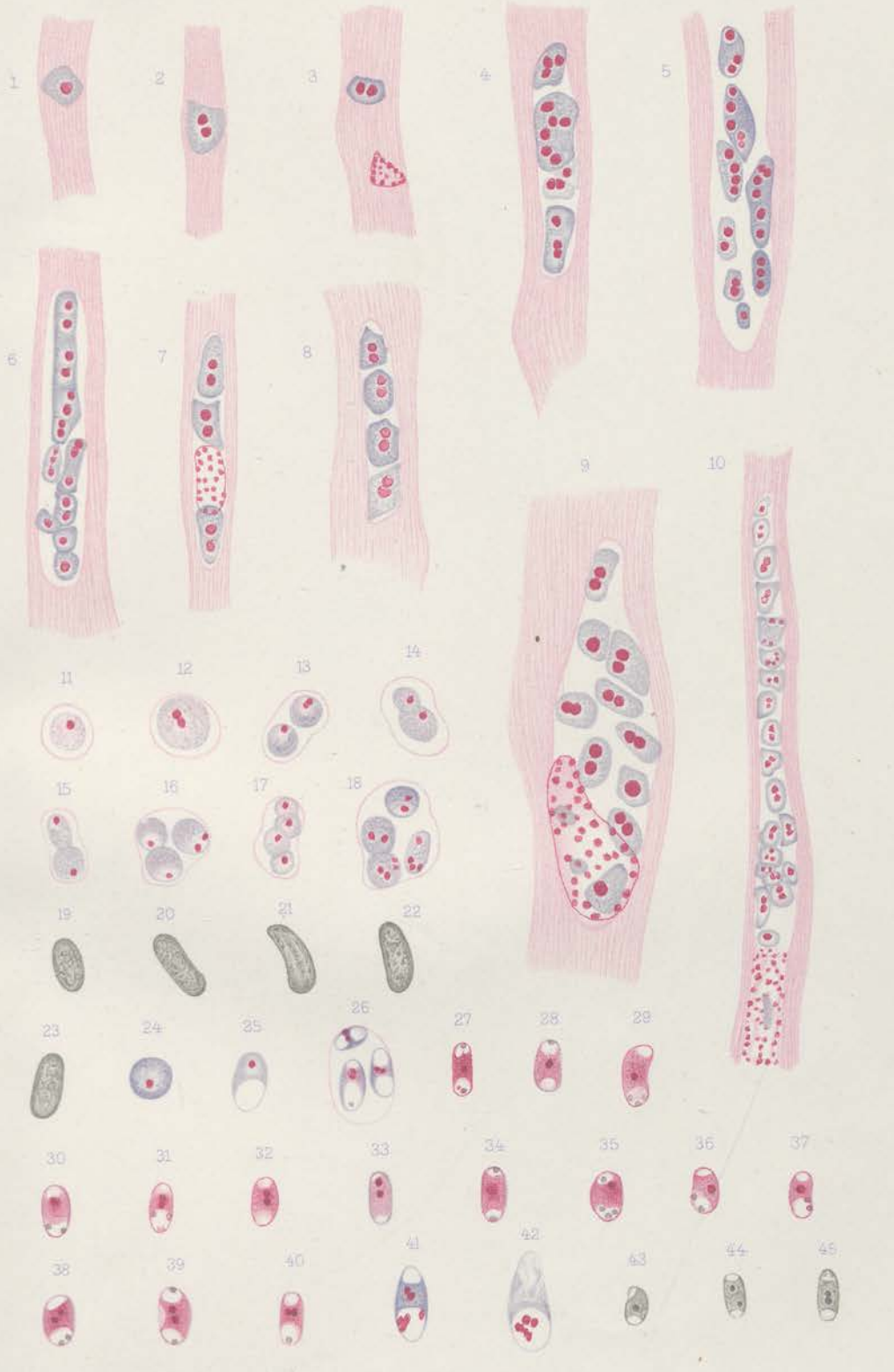


3.

Fig. 1 u. 2. Schnitte durch die Haut einer Ratte (Versuche zur „perkutanen" Infektion mit Recurrensspirochäten, Tabelle V, 5). Versilberung nach Levaditi und Nachfärbung mit Methylenblau. Fig. 1: Verletzung des Epithels, durch die die Spirochäten eindringen. Fig. 2: Lymphspalten aus einem etwas späteren Schnitt mit Spirochäten.

Fig. 3. Syphilitische Affekte am Auge eines Kaninchens. (Kaninchen Nr. 27, photogr. am 5. August. — Infektion durch Einträufeln von spirochätenhaltigem Material aus dem Hoden von Kaninchen in das unverletzte Auge.)

Verlag von Julius Springer in Berlin.



Verlag von Julius Springer in Berlin.

Diamphidia simplex.
(Diamphidia locusta.)

1. Cocon.
2. Käfer.
3. Geöffneter Cocon.
4. Larve.

Verlag von Julius Springer in Berlin.

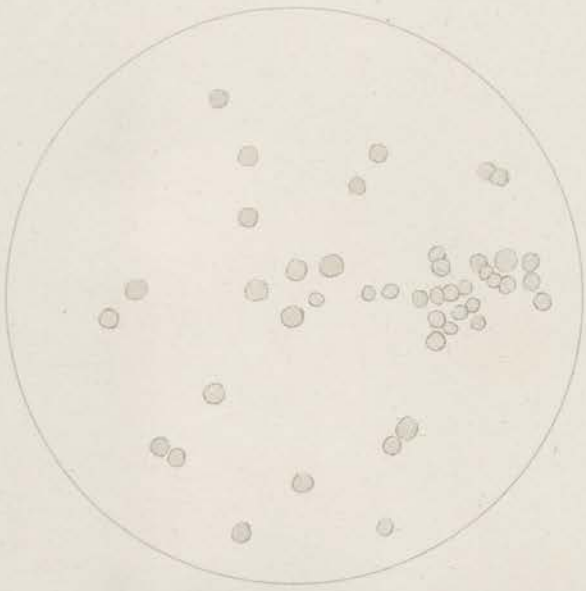


Fig. 1. Hellwachsende Vibrionenart.

Fig. 2. Gelbwachsende Vibrionenart.

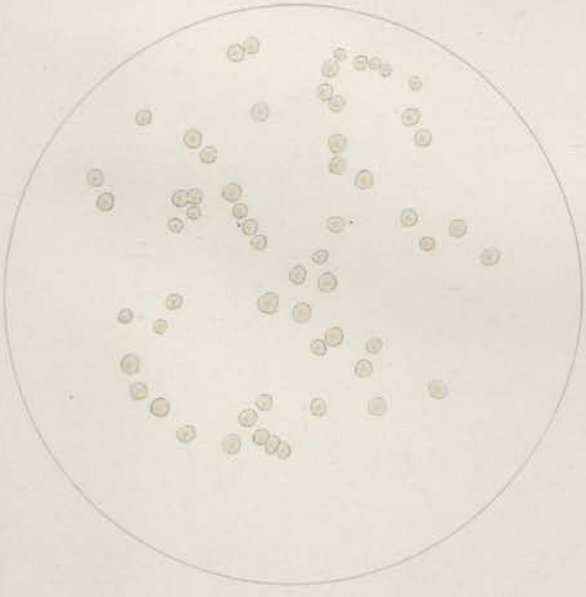


Fig. 3. Ringformen.

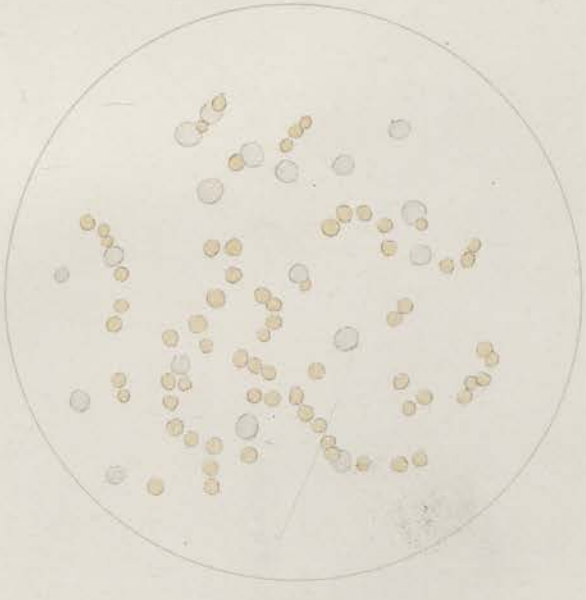
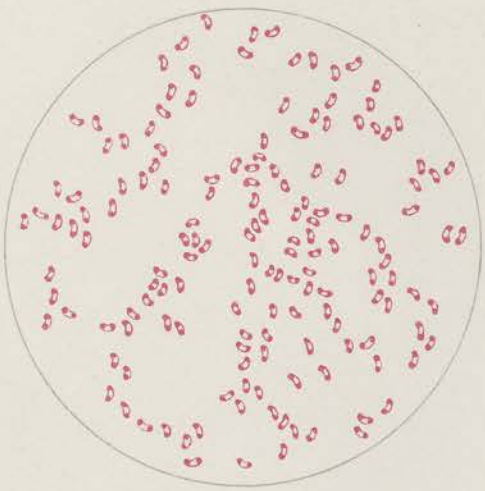
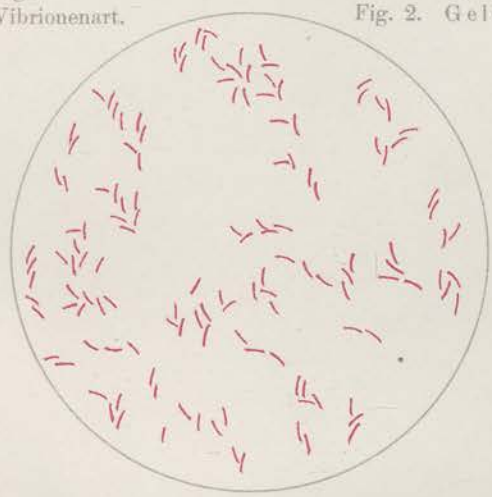


Fig. 4. Hell- und gelbwachsende Vibrionen eines gerade mutierenden Stammes.

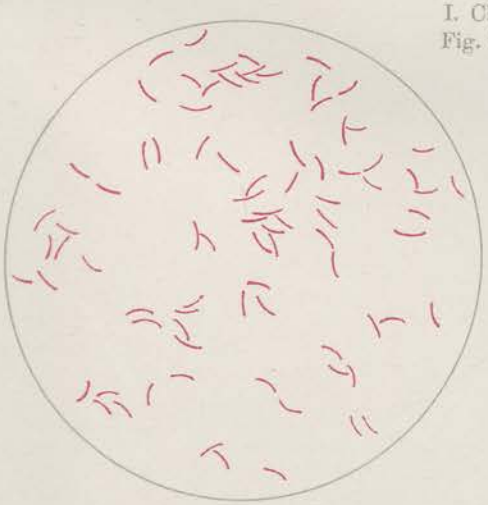
I. Cholera Freiburg.
Fig. 1. Hellwachsende Vibrionenart.



I. Cholera Freiburg.
Fig. 2. Gelbwachsende Vibrionenart.



I. Cholera Freiburg.
Fig. 3. Ringformen.



II. Cholera 74 vir.
Fig. 4. Hellwachsende Vibrionenart.

II. Cholera 74 vir.
Fig. 5. Gelbwachsende Vibrionenart.

Verlag von Julius Springer in Berlin.

Fig. 1. Schwach hämolysierende gelbe Vibrionenart von Chol. Heubeck.

Fig. 2. Nicht hämolysierende helle Vibrionenart von Chol. Heubeck.

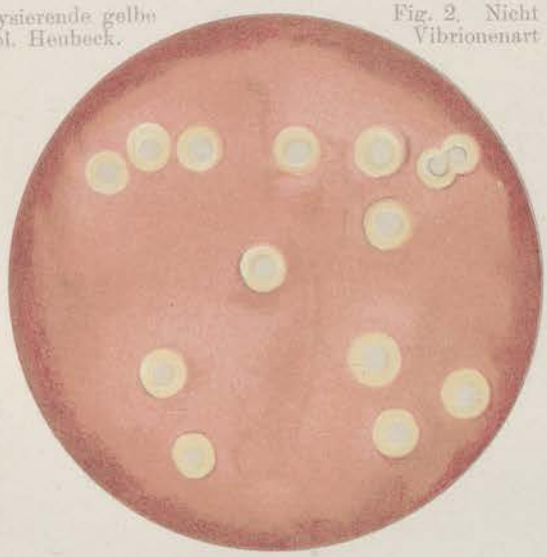


Fig. 3. Hämolysierende Chol. 74 vir.

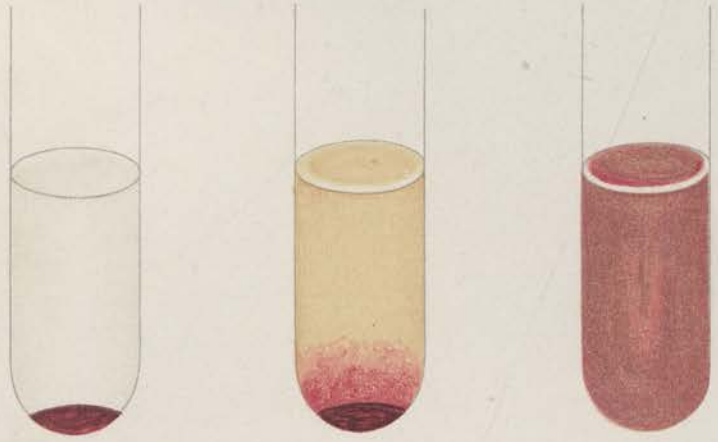


Fig. 4. Helle Varietät

Fig. 5. gelbe Varietät

Fig. 6. Chol. 74 vir.

von Cholera Heubeck.

Verlag von Julius Springer in Berlin.

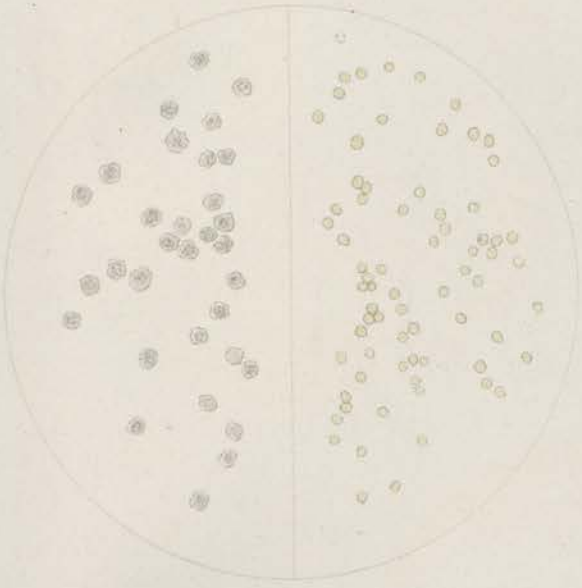


Fig. 1. Mutation bei Typhus Stettin (2. Typ):
1. helle, bröckelige Kolonien.
2 homogene, glattrandige, trübere Kolonien.

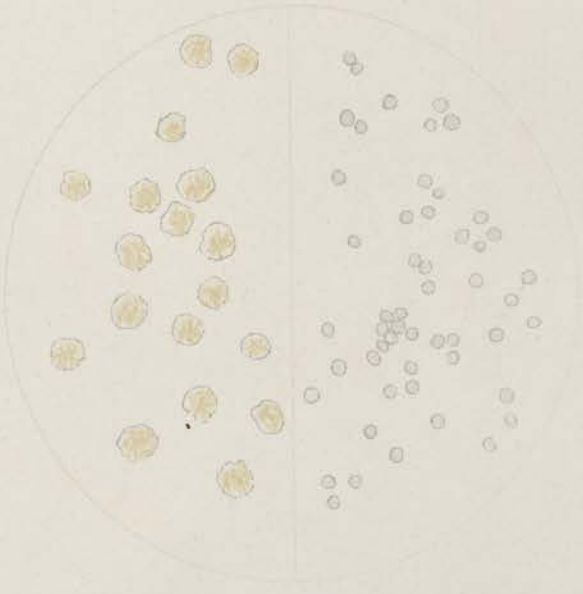


Fig. 2. Mutation bei Paratyphus B. Hellwig (1. Typ.):
1. grosse, trübe, aufgefaserte, weinblattförmige Kolonien.
2. kleine, homogene, helle, glattrandige Kolonien.

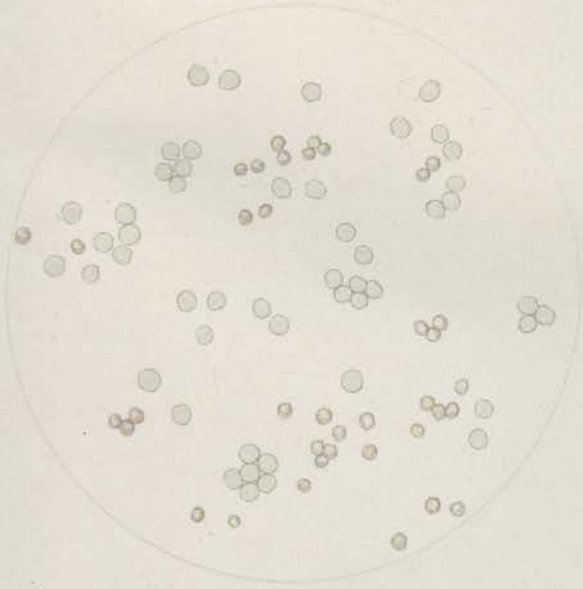


Fig. 3. Mutation bei Bac. enterit. Gaertner:
1. helle, durchscheinende Kolonien.
2. trübe, perlmutterglänzende Kolonien.

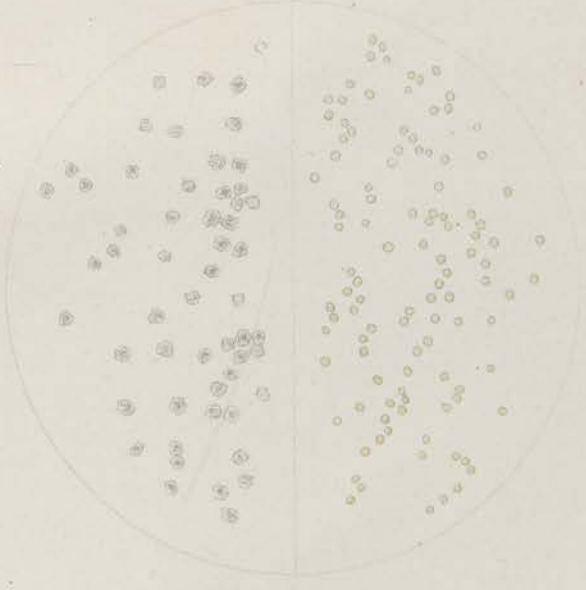


Fig. 4. Mutation bei Ruhr Shiga I (1. Typ.).
1. helle, durchscheinende, bröckelige Kolonien.
2. trübe, gelblichweisse, glattrandige Kolonien.

Verlag von Julius Springer in Berlin.

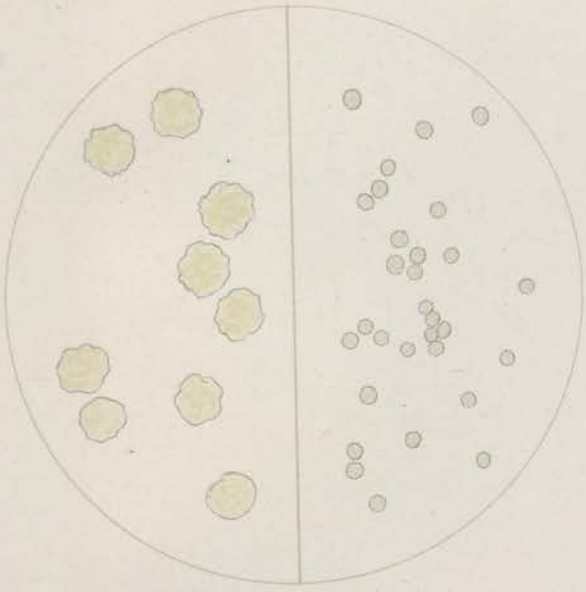


Fig. 1. Mutation bei Ruhr Grohlmann:
1. grosse, trübe, aufgefaserte Kolonien.
2. kleine, helle, glattrandige Kolonien.

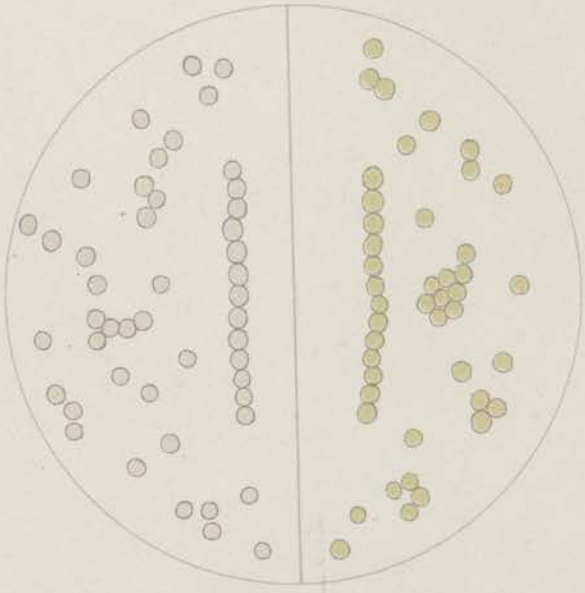


Fig. 2. Mutation bei Bact. coli:
1. helle, durchscheinende Kolonien.
2. trübe, gelbweisse Kolonien.

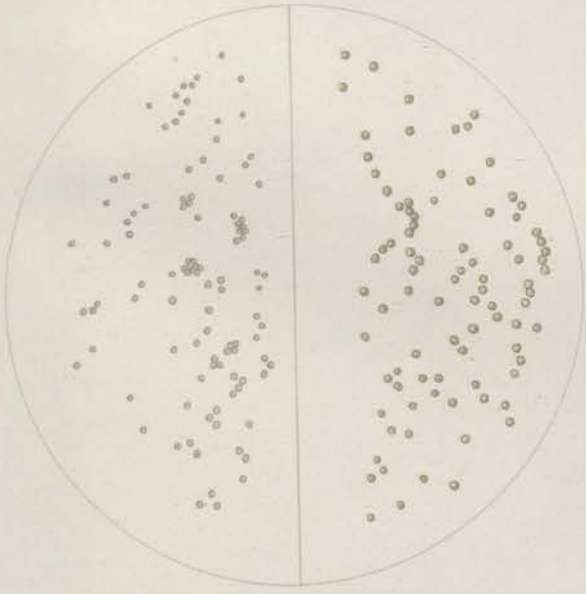


Fig. 3. Mutation bei Bac. faecal. alcaligenes.
1. helle, durchscheinende Kolonien.
2. trübe, stark irisierende Kolonien.

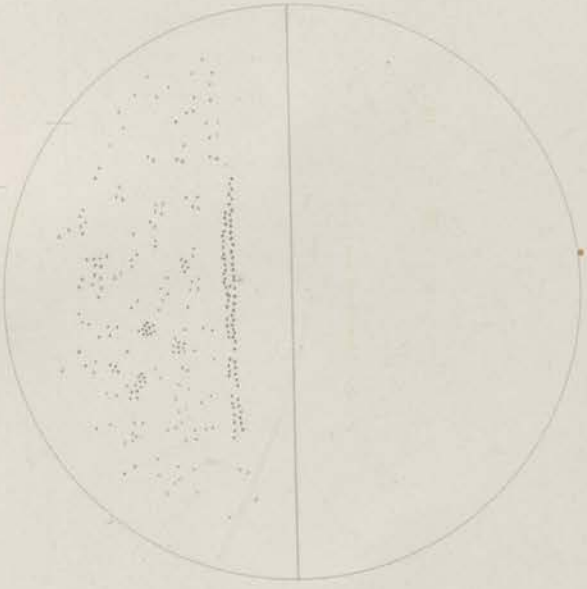


Fig. 4. Mutation bei Streptococcen:
1. helle, durchscheinende Kolonien.
2. trübe, undurchsichtige Kolonien.

Verlag von Julius Springer in Berlin.

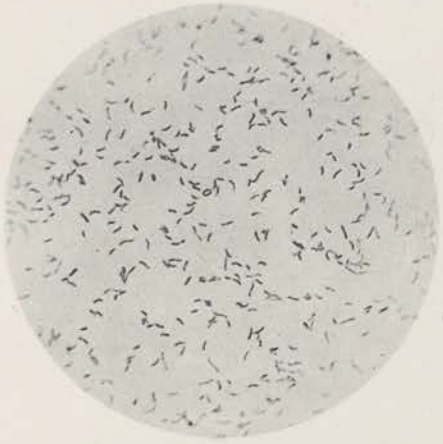


Fig. 1. Vibrio 819 Elbe:
helle, durchscheinende Kolonien.

Fig. 2. Vibrio 819 Elbe:
gelbweiße, undurchsichtige Kolonien.

Fig. 3. Typhus Stettin:
helle, durchscheinende, geriffelte Kolonien
(Fadenbildung).

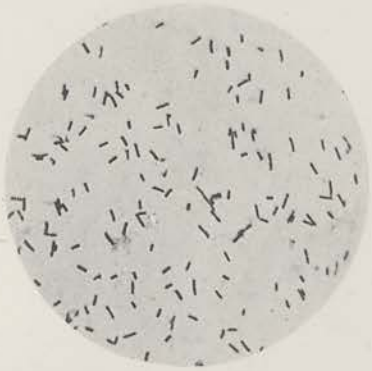


Fig. 4. Typhus Stettin:
homogene, glattrandige, trübere Kolonien.

Fig. 5. Paratyph B Hellwig:
große, aufgefaserte, geriffelte Kolonien.

Fig. 6. Paratyph B Hellwig:
kleine, homogene, glattrandige, irisierende
Kolonien.

Fig. 1. Bac. enterid. Gaertner: helle, durchscheinende Kolonien

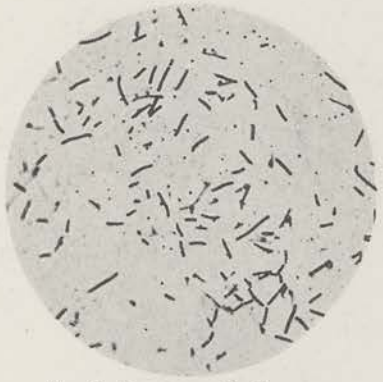


Fig. 2. Bac. enterid. Gaertner: gelbweißliche, perlmutterartigglänzende Kolonien.

Fig. 3. Ruhr Kruse-Shiga: größere, zerfließende, geriffelte (bröckelige) Kolonien.

Fig. 4. Ruhr Kruse-Shiga: gelbweiße, undurchsichtige, glattrandige Kolonien.

Fig. 5. Ruhr Ditthorn (Kruse-Shiga): helle, zarte, glattrandige Kolonien.

Fig. 6. Ruhr Ditthorn (Kruse-Shiga): gelbweiße, undurchsichtige, glattrandige Kolonien.

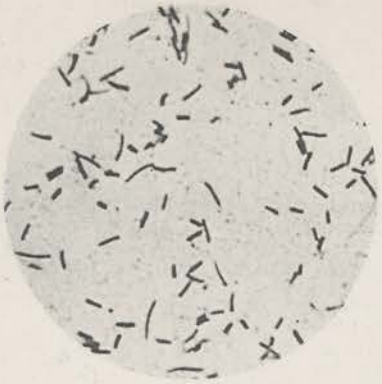


Fig. 1. Ruhr Grohlmann:
helle, durchscheinende, glattrandige Kolonien.

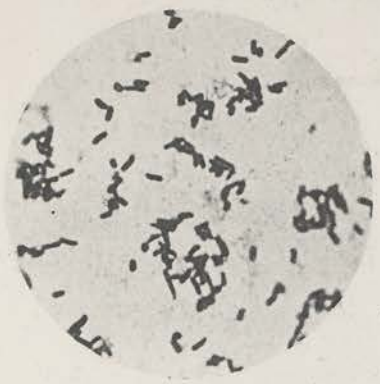


Fig. 2. Ruhr Grohlmann:
große, trübe, zackige Kolonien.

Fig. 3. Bact. coli P.10:
helle, durchscheinende Kolonien.

Fig. 4. Bact. coli P.10:
trübe, gelbweiße Kolonien.

Fig. 5. Bac. faecal. alcalig :
helle, durchscheinende Kolonien.

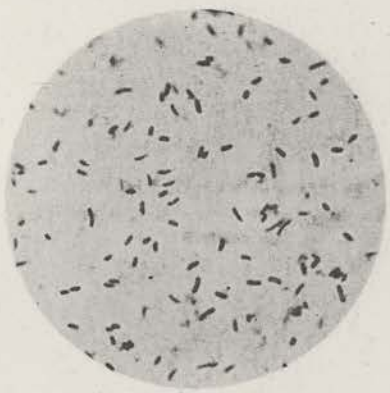


Fig. 6. Bac. faecal. alcalig.:
trübe, undurchsichtige, stark irisierende Kolonien.

Fig. 7. Streptococc. Höh.:
helle, durchscheinende Kolonien.

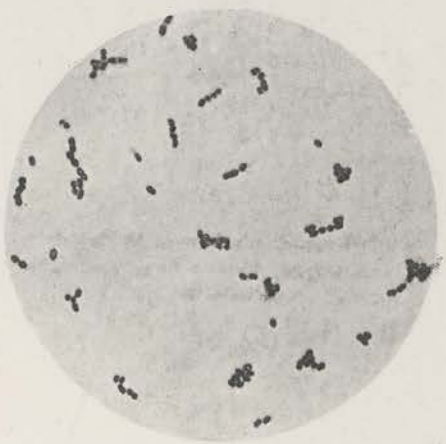


Fig. 8. Streptococc. Höh.:
trübe, gelbweißliche Kolonien.

Verlag von Julius Springer in Berlin.

ARBEITEN

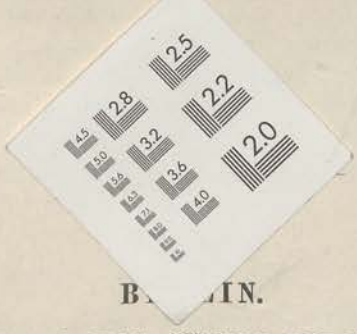
AUS DEM

KAISERLICHEN GESUNDHI

(Beihefte zu den Veröffentlichungen des Kaiserlichen G

VIERZIGSTER BAND.

MIT 11 TAFELN UND IN DEN TE T GEDRUCKTEN



B IN.
VERLAG VON JULIUS SPRINGER.
1912.

TIFFEN Color Control Patches © The Tiffen Company, 2007
Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black
Inches Centimetres