Ueber den Pleomorphismus bei Sarcina flava.

von FRITZ KLIMMEK.

Einleitung.

In dem Botanischen Institut zu Königsberg sind eine Reihe von Untersuchungen unternommen worden, die sich mit der Variation von Bakterien-Formen beschäftigten. Es wurden auf diese Weise mehr oder minder vollständig behandelt: Durch Max Koch[1]): Bacillus mesentericus, durch Fliegel[2]): Bacterium coli, durch Wilke[3]): Azotobakter chroococcum, durch Borm[4]): die N-sammelnden Endophyten von Alnus und Hippophaë, durch Rammelsberg[5]): Bacterium chitinovorum, durch Harder[6]): Nitrosomonas.

Es ließen sich bestimmte Entwicklungsfolgen und Zyklen zeigen, die sowohl auf der Platte wie auch innerhalb pflanzlicher Zellen auftreten. Der Pleomorphismus dieser Bakterien ist somit sicher festgestellt.

Die Ergebnisse sind zum Teil mit uns, gleichzeitig zum Teil schon vor uns durch Kuhn[7]), Löhnis[8]), Almquist[9]), Enderlein[10]) und K. B. Lehmann[11]) festgestellt worden.

Ueber die Deutung dieser Ergebnisse kann man verschiedener Meinung sein. Man kann sie als Lebensformen der Bakterien selbst auffassen, man kann sie als Sexualformen derselben deuten, wie es Löhnis, Almquist und Enderlein getan haben, oder man kann sie als durch Parasitismus erzeugt ansehen, wie es die Versuchshypothese von Kuhn und die von Ziegenspeck will. Dann muß man zwischen dem Kreislauf des Bakteriums und dem seines Parasiten (oder seiner Parasiten?) unterscheiden. Ja, man kann endlich, wie es K. B. Lehmann tut, einen skeptischen Standpunkt einnehmen. Das eine aber steht fest: es gibt einen Pleomorphismus, wobei eventuell die Frage offen bleibt, wie er entstanden ist.

Wir nahmen uns daher vor, an einem anderen Objekt als den bisher untersuchten Bakterien die Innenvorgänge genau zu studieren. Veranlaßt durch die Untersuchungen eines Schülers K. B. Lehmanns, Herrn Privatdozenten Dr. Schmidt-Kehl[12]), nahmen wir eine Sarcina. Die Untersuchungen sind zumeist bisher an stabförmigen Bakterien vorgenommen oder doch an solchen, die zeitweise diese Gestalt aufweisen, wie Azotobacter. Von den Sarcinen ist nun seit langem eine große Beständigkeit der Gestalt bekannt, es bestand daher eine gewisse Aussicht, hier unter Umständen einen Mangel an solchen Formen zu finden, wenn nicht gar die Hoffnung sich erfüllte, daß die Sarcinen sich als frei davon erwiesen. Gerade die Sarcinen der verwendeten Art zeichnen sich durch nur gering bemerkbare Abkultivierbarkeit aus. Wenn man irgendwo, die Parasitenhypothese angenommen, einen geringen Befall erwarten konnte, so war es hier. Außerdem sind die Sarcinen besonders dadurch bekannt, daß man sogen. Mutationen bei ihnen oft vorfindet. Wenn man den Gedankengängen der Sexualität folgt, so müßten die Erscheinungen des Pleomorphismus hier besonders reichlich auftauchen, wodurch die Möglichkeit zu Bastardierungen besonders gegeben wäre, und damit zu einer Bildung von neuen Formen oder gar zu einer wirklichen Mutation. Wenn aber keine solche Erscheinungen vorhanden sind, so muß das wieder ein interessantes Licht auf die Mutation werfen, welche dann hier, wie man schon früher vor der Kenntnis der vermeintlichen Sexualität annahm, nichts mit der Kreuzung zu tun hat. Es sei kurz auf den geschichtlichen Teil der Sarcina-Forschung eingegangen.

Schon im Jahre 1842 wurde von Goodsir[13]) für eine im Mageninhalt eines Kranken gefundene Bakterienart der Name Sarcina eingeführt und 1881 von Zopf den Coccaceae zugeordnet. Nägeli hatte die Sarcinen noch als ganz scharf charakterisiert angesehen, jedoch konnten durch Lehmann und Neumann[14]) Uebergänge zu den Mikrokokken deutlich gefunden werden. Artur Meyer[15]) und sein Schüler Ellis[16]) zeigten Eigenbewegung bei allen Formen und belegten diese durch gute Geißelpräparate. Die Sarcinen sind also Lebewesen, die durchaus nicht so eintönig sind, wie es auf den ersten Blick erscheint. Auch Sporen sollen bei ihnen vorkommen, wie die letztgenannten Autoren angeben. Matzuschita[17]) konnte sogar vereinzelte langgestreckte Formen nachweisen und Löhnis fand Neigung

zum Uebergang in kurze und lange Stäbchen. Schließlich wollen wir wörtlich die Zusammenfassung von Schmidt-Kehl zitieren:

„Der Uebergang von grampositiven Sarcinen (Sarcina lutea und agilis) in gramnegative Stäbchen und deren Rückverwandlung in Sarcinen wurde beobachtet. Ausgegangen wurde sowohl von den üblichen Reinkulturen als auch von Reinkulturen, die aus Einzellkulturen abstammten. Die Aenderung der Form kam auf festen und flüssigen Nährböden zustande und trat bei Einwirkung von Lithiumchlorid rascher, ohne diesen Reiz langsamer ein; sie erfolgte sprunghaft ohne Uebergänge. Von den gramnegativen Stäbchen wurden Einzelkulturen angelegt; in den aus ihnen stammenden Kulturen erfolgte ohne besondere Reize die Rückverwandlung in Sarcinen mit allen Eigenschaften der Ausgangsform".

Durch diese gründliche und, wie sich mein Lehrer Ziegenspeck auf Grund von Präparaten überzeugen konnte, auch unbedingt richtige Untersuchung, ist eine Mutation der Bakterien zu Stabformen sehr wahrscheinlich, wenn nicht gar sichergestellt. Es erhebt sich nun die Frage: Gehören diese Stabformen wirklich zu den Sarcinen, oder sind nicht andere Erscheinungsformen wie die sogenannten Mikrostäbchen bei Azotobacter vorhanden? Letztere gehören dann entweder zu den Sexualformen der Bakterien nach Löhnis oder zu den Parasitenformen nach Wilke und Ziegenspeck. Es stehen für die Deutung der Arbeit von Schmidt-Kehl, wie das ja auch K. B. Lehmann in skeptischer Weise betont, eine Reihe von Deutungsmöglichkeiten offen.

1. Es handelt sich um eine vegetative Mutation der Sarcinen in Stabformen, die eine wirkliche Neuerzeugung wäre.

2. Es handelt sich um eine nur selten zu beobachtende Schwärmform der Sarcinen. Wie bei Azotobacter könnte bei den Vorfahren der Sarcinen eine Schwärmform von Stabgestalt vorhanden gewesen sein, die sich dann später in eine Kugelform und dann Sarcinaform umgewandelt hätte. Die untersuchte Sarcina wäre nun eine Form, die nur sehr selten diese Schwärmform bildet. Vielleicht könnte gerade die Schädigung durch Lithiumchlorid sich so auswirken, daß eine sonst nur vorübergehend entfaltete Gestaltung, eine sonst sehr rasch übersprungene Jugendform dauernd gemacht wird. Wir kennen bei höheren Lebewesen ja solche Dinge sehr gut. Wir erinnern nur an Moose, wo bekanntlich durch geringes Licht und andere Schädigung solche Jugend-

formen dauernd werden. Es würde sich bei dieser Deutung als unbedingt notwendig herausstellen, die Entwicklungsgeschichte aller Sarcinen aufs Genaueste zu studieren.

3. Die Sarcinen sind Formen, die nur sehr selten eine „Sexualität" besitzen, und diese auf Grund besonderer Reize etwas vermehrt erscheinen lassen. Für gewöhnlich sieht man keine solche dem Sexualkreislauf angehörenden Gestalten. Auf Grund von Schädigungen oder anderen äußeren Anreizen könnten solche „Sexualformen" herauskommen.

4. Es handelt sich vielleicht um Formen, die irgendwie als Folge von Parasitismus auftauchen. Es kann sich dabei um Erscheinungsformen des Parasiten handeln, bei denen man die Inhaltsbestandteile der Parasitenkörnchen sehen müßte.

5. Es handelt sich eventuell um Riesenformen, die infolge des Parasitismus aus den Bakterien gebildet werden und die nicht den Parasiten führen.

Wir sehen also, daß eine genaue Verfolgung des Pleomorphismus der Sarcinen unbedingt nötig ist, um vielleicht in diese sehr interessanten Fragen ein Streiflicht zu werfen, wenn man auch noch nicht zu einer endgültigen Lösung vordringen kann.

Nicht über diese behandelte Gruppe von Sarcinen, sondern über anaërobe eigenartige Gärungssarcinen handelt eine Monographie von Smit[18]). Wir wollen nicht die speziellen Fragen hier herausgreifen, welche in diesem Zusammenhange nicht interessieren, sondern die mehr allgemeinen Beobachtungen. Wir haben hier eine gute Zusammenstellung der Literatur, die wir daher hier nicht aufzuführen brauchen, indem wir auf die Arbeit verweisen. Wir wollen hier nur einige Momente herausgreifen, welche uns von Wichtigkeit für unser Problem erscheinen und die auch sonstwie wertvoll für die Beurteilung der Gestaltung der Sarcinen sein können.

Smit beschäftigt sich mit den anaëroben Gärungssarcinen. Besonders eigenartig sind die Versuche mit Sarcina ventriculi, die sehr schwer züchtbar ist. Beijerinck konnte die Sarcinen, welche er im Boden gefunden hatte, nur solange weiterimpfen, als eine Gärung vorhanden war, bei mangelnder Gärung waren die Impfversuche ergebnislos. Die Untersuchung von Boas ergibt Formen von Sarcinen, welche glänzen. In der Vitalfärbung ist das Ergebnis beachtenswert, daß die jungen lebensfähigen Formen sich nicht anfärben, während das die alten leicht tun.

Die Gefärbten haben ihr „kurzes Dasein offenbar schon vollendet". In Hinblick auf die Nitrososarcina, die auch in stark sauren Böden sich von Harder isolieren ließ, ist die Resistenz gegen Salpetersäure in relativ hohen Konzentrationen (bis PH 1,35) erwähnenswert.

Die Gärungssarcina ist nur in aëroben Kulturen so leicht abkultivierbar, in anaëroben dagegen ist sie bis 4 Wochen lebensfähig. Man könnte hierbei eine Phagie vermuten. die aërob ist, oder die durch Verschlechtern der Lebensbedingung hervorgerufen oder vermehrt wird.

Eigenartig sind die Ergebnisse des Aufsuchens von Gärungssarcinen in der Natur. Es ist nicht möglich, diese in der Natur sichtbar zu machen, womit aber unserer Ansicht nach nicht gesagt ist, daß nicht doch solche Formen vorkommen, wenn auch in Ritzen kolloidaler Medien eingeschlossen, die unter Umständen die Luft nur schwer durchlassen und dadurch die Anaërobier länger leben lassen. Das lange Ueberleben von Anaërobiern, auch solcher, die man nicht an der Luft kultivieren kann, in Böden, also kolloidalen Medien, ist bekannt. Die Dauerformen der Natur sind widerstandsfähiger gegen Erhitzen als die aus den Kulturen erlangten. Auch das verwundert uns nicht. Es ist sehr wohl verständlich, daß sich phagische Erscheinungen da am meisten geltend machen, wo viel Bakterien vorhanden sind, dagegen in dem Boden weniger auftreten. In den Kulturen haben solche leicht abkultivierbaren Bakterien oft gar keine Zeit, Dauerformen zu bilden, weil sie schon vorher oft restlos den Phagen zum Opfer fallen. Wir haben solche Dinge bei Endophyten von Hippophaë gut beobachten können. Hier kann man auch nach einiger Kultur gar keine Bakterien mehr erhalten.

Mit Lithiumchlorid beobachtete Smit keine Wandlungen. Es kommt zur Bildung von Einzelkokken, andere Bakteriengestalten wie sie Schmidt-Kehl beschreibt, konnte er nicht sehen. Es könnten aber doch Formen vorhanden sein, die bei dem von Smit verwendeten einfachen Färbeverfahren nicht herauskamen.

Die Sarcina gibt keine filtrierbare Form. Eine Bakteriophagenlösung soll sich nicht haben darstellen lassen. Die Phagen gegen Bacterium coli und Bacillus megatherium waren unwirksam. Es ist denkbar, daß durch die lange Kultur in stark sauren Medien usw. der spezifische Phage gegen diese Zymosar-

cina abhanden gekommen ist und die unspezifischen oder anders gearteten Phagen die Sarcina nicht so stark angreifen, daß Bakteriolyse einsetzt. Anders darf man die Versuche, die nur in diesem Sinne angesetzt wurden, nicht werten.

Aus den Betrachtungen möchten wir das Schlußwort wörtlich zitieren:

„Ueberblickt man die Ergebnisse des letzten Kapitels, so muß man zugeben, daß die Frage nach der Oekologie von Zymosarcina ventriculi noch ziemlich weit von ihrer endgültigen Beantwortung entfernt bleibt. Es läßt sich zusammenfassend nur dieses sagen, daß ihre Gegenwart gebunden zu sein scheint an die mehr oder weniger verunreinigten Stellen der Erdoberfläche, an welchen sie sich sozusagen unbegrenzt lange behaupten und sich vermehren kann in einer latenten, bis jetzt unsichtbaren, gegen Aufbewahrung und Erhitzen und gegen Chemikalien sehr widerstandsfähigen Form. Dieselbe hat wahrscheinlich nicht den Charakter einer Spore und kann ebensowenig eine Filterkerze passieren. Unter geeigneten Umständen geht sie auf irreversible Weise in die bekannte Warenballenform über, womit sie alle die genannten Eigenschaften der Widerstandsfähigkeit verliert. Sehr wahrscheinlich hat diese Naturform die Gestalt eines kleinen Kokkus, welcher sich der direkten mikroskopischen Beobachtung in Erde oder Sand entzieht. Die Warenballenform würde dann die zweite Stufe ihres Lebenszyklus darstellen. Welches die weiteren Stufen sein werden, läßt sich bis jetzt nicht voraussagen. Es scheint sogar fraglich, ob es überhaupt solche geben wird: nach zwei Tagen sterben die Sarcinen ab und etwaige neue Formen müßten sich also aus den toten Bakterien bilden. Ob die latente Naturform sich auch in andere Formen umgestalten kann, bleibt einstweilen unentschieden. Späterem Studium muß es vorbehalten bleiben, in diese schwierige Frage neues Licht zu bringen".

Wir möchten die Lösung der Frage in der Richtung erwarten, daß die Phagen in der Reinkultur so überhandnehmen, daß sie die Entstehung von Arthrosporen unterbinden, die wir bei unserer Sarcina beobachtet haben. In der Natur ist das nicht der Fall.

Nachdem wir so absichtlich nur die neueste Literatur behandelt haben, ersehen wir, daß es einmal sehr wünschenswert ist, den Pleomorphismus der Sarcina auf Grund gut fixierter und gefärbter Präparate zu untersuchen. Wir wollen dabei dessen

eingedenk sein, daß alle Deutungen heute noch hypothetisch sind und wir uns daher bestreben, die Ergebnisse objektiv zu gewinnen, ohne uns durch Hypothesen leiten zu lassen.

Eigene Untersuchungen.

Wir wählten für unsere Untersuchungen Sarcina flava, die uns Herr Professor Dr. Grimmer vom Molkereiwissenschaftlichen Institut Königsberg zur Verfügung stellte. Zunächst müssen wir die Arbeitsmethoden kurz schildern, nach denen wir verfahren haben. Als

Nährboden

benutzten wir einen Fleischextrakt-Agar nach Angabe von Löhnis (Landw. bakteriol. Praktikum): 1000 ccm Leitungswasser + 10 g Liebigs Fleischextrakt + 10 g Pepton siccum Witte + 5 g Kochsalz, dazu noch 2% Agar und 1/4% Glukose. Nach dem Erhitzen im Autoklaven neutralisierten wir die saure Nährlösung mit Sodalösung unter Zuhilfenahme von Lakmuspapier, sodaß wir die Gewähr hatten, einen völlig neutralen Nährboden zu besitzen. Das Sterilisieren des Nährbodens und das Impfen geschah mit der peinlichsten Vorsicht und Sauberkeit. Um das lästige Kondenswasser zu vermeiden, das sich beim Sterilisieren im Autoklaven stets in den Petrischalen ansammelt, und das eine Fremdinfektion begünstigt, sterilisierten wir die Petrischalen im Heißluftschrank, nachdem wir noch den Deckel der Petrischalen mit Filtrierpapier ausgelegt hatten, das den Zweck hatte, später eventl. auftretendes Kondenswasser sofort aufzuziehen. Den Nährboden selbst sterilisierten wir in Reagenzgläsern im Autoklaven und gossen danach den Nährboden in die sterilen Schalen, und zwar in einem ruhigen, möglichst staubfreien Zimmer. Mit jeder nur möglichen Sauberkeit versuchten wir Fremdinfektion zu verhindern. Das

Isolieren der Reinkultur

mußten wir, leider nicht im Besitze eines Mikromanipulators, nach dem Verdünnungsverfahren vornehmen. Da wir von Anfang an auf Agar arbeiten wollten, verwendeten wir ein Wasserverdünnungsverfahren nach Pasteur, das auf Agar zugeschnitten ist. Wir zerteilten eine Oese aus der uns zur Verfügung gestellten Sarcinakultur in ca. 10 ccm sterilem Wasser, verdünnten nur 2 Oesen davon in 1 Reagenzröhrchen I, davon nach Umschütteln wieder 2 Oesen in ein Röhrchen II. Diese hohe Verdünnung gossen wir in einem ruhigen Zimmer auf die steril gegossenen

Platten, warteten ein paar Sekunden, gossen rasch den Ueberschuß ab und bewahrten die geimpften Platten in einem Brutschrank bei einer konstanten Temperatur von 30° auf. Wir erhielten so Platten ohne und welche mit nur einer einzigen Kolonie. Die Wahrscheinlichkeit, eine Ein-Zellkultur zu bekommen, ist also wirklich sehr groß. Das nunmehr gereinigte Material bestand, wie uns Vermehrungen auf Schrägagar zeigten, tatsächlich aus reinen Sarcinen. Wir gingen stets von jungen Abstrichen aus, die noch keine Dauerformen zeigten.

Unsere Versuche gingen darauf hinaus, möglichst reine Bakterienkulturen zu bekommen; wir wiederholten deshalb das Reinigungsverfahren noch dreimal, um ja jede Verunreinigung auszuschalten. Die Seltenheit der Erscheinungsformen von Umwandlungen in den Sarcinen, die sich bei uns herausstellte, könnte vielleicht auf diese ganz penible Vorbehandlung mit zurückzuführen sein. Da der Verdacht auf filtrierbare Keime vorlag, so wollten wir auch durch diese oftmalige Reinigung solche Dinge nach Möglichkeit vermeiden. Wenn es filtrierbare Formen sind, die die Ursachen der Wandlungen sind, so müssen wir diese durch oftmaliges Reinigen wenigstens dann entfernen können, wenn sie spezifische Begleiter der Sarcinen sind, die nicht endogen in den Formenkreis der Sarcina selbst gehören. Sind dagegen außer ganz spezifischen Erregern solcher Umwandlungen noch unspezifische vorhanden, so werden wir diese niemals beseitigen können, weil sie nur zu leicht hereingebracht werden, wenn man auch keine Bakterien als Verunreinigung nachweisen kann.

Weiterhin haben wir von Anfang an eine gewisse Auslese geschaffen dadurch, daß wir die Kulturen auf 40° C drei Tage lang heiß kultivierten.

Herstellung der Präparate

Wir wollen nun die Verfahren schildern, die wir bei unseren Versuchen anwendeten. Es war uns klar, daß man niemals mit einer Flammenfixation irgendwelche Feinheiten innerhalb der Bakterien sehen kann und gerade auf diese legen wir besonderes Gewicht, denn manche der Außenerscheinungen müssen in den Innenerscheinungen ihre Ursache haben. Wir beschritten daher folgenden Weg: Aus einer geimpften Platte schnitten wir 4 Stücke des festen Nährbodens heraus und bedeckten damit vier vorher strengstens entfettete Objektträger, jedoch mit der Bakterienschicht nach unten, sodaß die Sarcinen auf den Objektträger zu liegen

kamen. Die Entfettung der Objektträger geschah durch langes Kochen in konzentrierter Schwefelsäure, wodurch auch etwa anhaftende organische Fremdkörper beseitigt wurden. Darauf fixierten wir sofort mit der Kuhn'schen Reihe:

1. Heiße konzentrierte wässerige Sublimatlösung,
2. Caliumbichromat-Essigsäure 15 Minuten (100 ccm H_2O + 3 g $K_2Cr_2O_7$ + 5 ccm CH_3 COOH),
3. 75%igen Alkohol, 3 mal zu je 5 Minuten,
4. 50%igen Alkohol, 2 mal zu je 5 Minuten,
5. 25%igen Alkohol, 1 mal 5 Minuten,
6. Wässern in Aqua dest.

Darauf wurden die Objektträger in einen feuchten Raum gestellt und 24 Stunden stehen gelassen, bis sich die Bakterienschicht fest an das Glas legte. Nun wurden die Agarstücke vorsichtig abgenommen und nochmals auf 4 weitere Objektträger gelegt, um die untere Schicht der Sarcinen untersuchen zu können. Wir stellten uns also von jeder Platte Präparate sowohl von den oberflächlichen, als auch von den tief liegenden Zellen her. Nach gleichfalls 24stündigem Aufenthalt in feuchtem Raume wurden diese Objektträger ebenso wie die ersteren der Färbung unterzogen. Als besonders günstig erwies sich die Much-Schottmünster'sche Granulafärbung:

1. Carbol-Methylviolett 24 Stunden (10 ccm alkohol. Methylviolett, 100 ccm 2%iges Phenol, filtriert),
2. Lugol'sche Lösung 13 Minuten,
3. 5%ige Salpetersäure 1 Minute,
4. 3%ige Salzsäure 10 Sekunden,
5. Aceton + Alkohol zu gleichen Teilen, bis kein Farbstoff mehr entweicht,
6. gründliches Auswaschen mit Wasser,
7. Kontrastfärbung mit 1%iger Safraninlösung ca. 10 Sekunden, trocknen lassen und Canada-Balsam.

Die Färbung nach Heidenhain erwies sich bei uns nicht so gut, weil sie keine Kontrastbilder gab. Es war uns von vornherein klar, daß wir bei der Untersuchung der Sarcinen mit vielen Schwierigkeiten zu kämpfen hatten, wenn wir die Erscheinungsformen beobachten wollten, die man bisher bei Stabformen als anomal erkannt hatte, also z. B. Symplasmabildung, Siegelringformen usw., weil diese bei Stäbchenbakterien auffälligen anomalen Bildungen meist Kugelform besitzen und sich gestaltlich kaum von normalen Sarcinen unterscheiden lassen. Aus diesem Grunde eignete sich die Färbung nach Heidenhain nicht so gut, immerhin gab sie gute Uebersichtsbilder. Der Gang der Färbung ist der gewöhnliche:

1. 5%ige Eisenalaunlösung 24 Stunden, gut abspülen,
2. Färben in Hämatoxylinlösung 1—3 mal 24 Stunden, gut abspülen,
3. Differenzieren in 3—5%iger Eisenalaunlösung 1—10 Minuten. Der gewünschte Differenzierungsgrad ist unter dem Mikroskop (Wasserimmersion) zu erreichen.,
4. 25%igen, 50%igen, 75%igen, 96%igen und 100%igen Alkohol,
5. Xylol, Canadabalsam.

Eigentümlich war es, daß Sarcinen junger Kulturen sehr schnell den Farbstoff aufnahmen und ihn nur sehr schwer abgaben, sodaß mitunter weniger als 24 Stunden genügten, um vollkommene Dunkelfärbung zu erzielen. Mit zunehmendem Alter der Kulturen nahm aber die Färbbarkeit proportional ab, sodaß wir alte Kulturen oft 3 Tage und darüber färben mußten.

Jede Platte, die fixiert wurde, wurde gleichzeitig bei Vitalfärbung mit Polychrom-Methylenblau untersucht. Die Sarcinen zeigten sich darin als die typischen bekannten „Warenballen", häufig in lebhafter Bewegung infolge Brown'scher Molekularbewegung. Die beobachteten Einzelheiten stimmten mit den Dauerpräparaten überein, wenn sie bei der Vitalfärbung auch ungleich schwerer zu beobachten waren, da die Sarcinen sich kolossal stark färbten und Einzelheiten kaum oder nur sehr schwer erkennen ließen. Immerhin sah man aber die Formen, die sich durch ihre Gestalt oder Größe von den normalen Sarcinen unterschieden, wie „Amöben"formen und Cystenbildung auch hier aufs Deutlichste auftreten.

Die bisherigen Erfahrungen mit anderen Bakterien ergaben, daß die anomalen Formen bei unmittelbarer Kultur seltener auftreten, wenn auch darin eine große Verschiedenheit innerhalb der Arten besteht. Wenn man die Bakterien durch irgend einen Umstand schädigte, so konnte man die merkwürdigen Formen leichter erzielen. Die Gegner der Sexual- und der Parasitentheorie sahen in diesem Verhalten einen Einwand. Sie erklärten die Erscheinungen nur als krankhafte Bildungen und benannten sie mit dem Begriff der „Involutionsformen". Es ist nun unsere Aufgabe, auch einmal dieses schädigende Mittel anzuwenden und zu sehen, ob sich in Kulturen mit Zusatz von 1% Lithiumchlorid nicht die anomalen Formen in erhöhtem Maße erzielen lassen. Wir kultivierten also zwei Reihen, eine auf normalem Nährboden, die andere unter Zusatz von 1% LiCl. und fixierten stets zwei entsprechende Platten der beiden Reihen.

Wir gehen nun zur Besprechung der einzelnen Präparate über.

9 Stunden, Oberschicht.

Auf dem Präparate, das von einer 9 Stunden alten Kultur hergestellt wurde, sieht man nur sehr vereinzelte Sarcinen. Nach der Much'schen Farbmethode sind sie negativ, d. h. durch die Kontrastfärbung rot gefärbt. Doch beobachtet man winzige Körnchen sowohl innerhalb als auch außerhalb der Sarcinen, die positiv, d. h. schwarzblau gefärbt sind. Die Sarcinen selbst erscheinen gewöhnlich in ihrer typischen Paketform, doch beobachtet man auch Zweier-Stadien, nicht selten auch Einzelzellen. Immer wieder kommen vereinzelte Zellen mit positiv gefärbten Körnchen vor. Außer den relativ großen Kokken findet man kleinere mit einem positiv gefärbten Binnenkörper, der außen herum eine schwach negativ gefärbte, scheinbar leere Hülle besitzt. An manchen Stellen ist zu erkennen, daß dieser Binnenkörper noch eine feinere Effiguration besitzt, die aber an der Grenze der Auflösungsfähigkeit des Mikroskops liegt. Diese Körnchen, die man vereinzelt auch außerhalb der Sarcinen findet, nehmen ungefähr $^1/_5$ des Sarcineninhaltes ein Ganz eigentümlich sind positiv gefärbte winzige Stäbchen, die ganz vereinzelt auftreten und die wir zuerst für eine Verunreinigung hielten, die wir aber trotz sorgfältigster Sauberkeit nicht zum Verschwinden bringen konnten. Eigentümlicherweise traten diese Stäbchen nur in jungen Kulturen etwas zahlreicher auf, in älteren waren sie so gut wie ganz verschwunden. In diesen Stabformen sieht man deutlich dieselben Körnchen auftreten, die denselben ein ganz bakterienunähnliches Aussehen geben. Die Stäbchen scheinen zu zerfallen und dadurch die Körnchen zu erzeugen. Uebergangsglieder von solchen Stäbchen zu den Körnchen sind nicht selten zu sehen.

In dem Präparat bemerkt man ferner deutlich größere gestaltlose Formen, in denen positiv gefärbte Körnchen in Einzahl liegen. Mitunter kann man sehen, daß sich die Körnchen innerhalb der Sarcinen scheinbar geteilt haben, sodaß jetzt zwei in einer Zelle sichtbar sind. Im allgemeinen jedoch gehören die körnchentragenden Sarcinen zu den Seltenheiten gegenüber der großen Masse normaler Zellen. Bei der Färbung nach Heidenhain sieht man, daß ein Teil der Sarcinen die Farbe nur ganz schwach angenommen hat. Ferner findet man im Impfmaterial Sarcinen, welche Vakuolen haben, dann solche, bei denen an den Vakuolen schwarze Körnchen liegen und schließlich solche, die ganz leer sind. Bei einigem Suchen findet man Sarcinen, die zerfallen und winzige schwarze

Körnchen entlassen. Desgleichen findet man auch die kleinen Stäbchen mit den Körnchen wieder. Mitunter sind in fast leeren Sarcinen mehrere Körnchen, meist 8 zu erkennen. Relativ häufig findet man an großen Sarcinen diese kleinen Körnchen angelagert, oft sogar mehrere. Die Größe dieser Körnchen beträgt hier ebenfalls ungefähr $^1/_5$ der normalen Sarcina-Zellen. Vereinzelt sind auch Formen zu beobachten, die an Siegelringe erinnern und deshalb als Siegelringformen bezeichnet werden sollen. Mitunter hat es den Anschein. als ob diese Siegelringformen „auskeimten": Aus dem Siegelring tritt nämlich ein keimartiger Bruchsack heraus, in dem mehrere Körnchen in Erscheinung treten. Hin und wieder sieht man schwarze Körnchen über das Gesichtsfeld verstreut, die ebenfalls Teilungsstadien zeigen. Ueber die Deutung dieser Körnchen sind wir uns nicht im Klaren. Es könnten Zwergformen der Sarcinen sein, es könnten aber auch Formen sein, die zu den übrigen Körnchen gehören oder gar mit ihnen indentisch sind. Die Größendimensionen würden gut dazu passen. Eigenartige umfangreiche braune Massen dürften unserer Ansicht nach Kongregationen oder dergl. sein.

9 Stunden, Oberschicht, mit LiCl.

Man sieht sehr wenig Sarcinen, gewöhnlich sind sie nach Much negativ oder nach Heidenhain tief schwarz gefärbt. Vereinzelt findet man ungefärbte Sarcinenhüllen mit dunklen Körnchen darin. Ferner sieht man ganz leere Hüllen, sowie einzelne Siegelringformen. Auch hier kann man bei einzelnen Formen an günstigen Stellen das Auskeimen beobachten. Einzelne körnchenführende Stäbchen sind ebenfalls sichtbar. Man sieht weiterhin große unregelmäßige Formen mit ca. 16 kleinen Körnchen darin, die eigenartigerweise stark lichtbrechend sind. Alles ist im Verhältnis zu den intakten Sarcinen relativ selten sichtbar.

Wir sehen also, daß zwischen der normalen Reihe und der Reihe mit LiCl ein wesentlicher Unterschied nicht besteht.

Da wir auf dem Präparat, das von einer 9 Stunden alten Kultur von unten entnommen wurde, fast nichts sehen, lassen wir die Beschreibung fort.

18 Stunden, Oberschicht.

Auf diesem Präparat fällt die riesenhafte Vermehrung der Sarcinen auf. Die Kultur selbst wuchs auf der Platte ganz regelmäßig, ohne sichtbare Nester oder Löcher. Man sieht fast lauter

intakte Sarcinen und man muß schon ziemlich lange suchen, bis man die Körnchen wiederfindet. An besonders günstigen Stellen bemerkt man, daß diese Körnchen in kleinen Nestern auftreten. Man hat den Eindruck, als ob solche körnchenführenden Sarcinen anschwellen und unter vorhergehender Vermehrung und Freigabe der Körnchen die benachbarten Sarcinen befallen oder anstecken. Solche „infizierten" Sarcinenpakete schwellen zu unregelmäßigen Gebilden an, in denen die Zellgrenzen aufgelöst werden und schließlich den Eindruck „symplasmaartiger" Haufen erwecken. Alle Stadien von der beginnenden „Infektion" bis zu diesen Symplasmen sind vorhanden. Es finden sich Riesenzellen, welche eine große Masse der Körnchen enthalten und vollkommen die Gestalt der Sarcina verloren haben. Daß es sich in Wirklichkeit nicht um einen Farbfehler oder dergl. handelt, bezeugen einzeln liegende solche Bildungen. Mitunter erscheint es, als ob man leere Hüllen deformierter Sarcinen ohne Körnchen vor sich hätte. Besonders weisen wir darauf hin, daß oft von den Sarcinapaketen eine einzige oder mehrere Kokken nach der Much'chen Färbung positiv sind, während der Rest deutlich negativ gefärbt ist. Man gewinnt den Eindruck, als ob diese positiv gefärbten Massen sich unter Umständen auflösen können und dann Scharen winzigster Körnchen entlassen, die dieselbe Größendimension wie die bisher beschriebenen besitzen. Auf dem nach Heidenhain gefärbten Präparat finden wir Sarcinenballen eingestreut, die eigentümlich stark lichtbrechend sind und infolgedessen hell gänzen. Bei oberflächlicher Einstellung des Mikroskops erkennt man, daß diese glänzenden Ballen ein fein durchlöchertes Aussehen haben. Vielleicht handelt es sich hier um Reservestoffe, die die Sarcinen angehäuft haben, eventl. Oeltröpfchen. Schließlich finden wir wieder winzige Stäbchen, die in ihrem Innern die Körnchen führen, wenn auch relativ seltener als im ersten Präparat.

18 Stunden, Oberschicht, mit LiCl.

Auffallend ist auch hier die dichte Lagerung der Sarcinen. Die Platte selbst zeigte ein ganz regelmäßiges und normales Wachstum. Auf dem Präparat sieht man fast lauter normale Sarcinen. Hat man aber die körnchenführenden Formen gefunden, so beobachtet man, daß diese in kleinen Nestern zusammenliegen. Winzige kleine Stäbchen mit dunkleren Partien sind sichtbar, desgleichen vereinzelte Bruchsackformen, die wir als keimende Siegel-

ringstadien in dem ersten Präparat ansprachen. Auffallend ist auch hier die Seltenheit, in der solche anomalen Formen auftreten. Bei der Färbung nach Heidenhain kommen auch hier die stark glänzenden Sarcinamassen zum Vorschein, die ziemlich gleichmäßig gelagert sind.

18 Stunden, Unterschicht.

Man sieht kaum irgendwelche Unterschiede gegenüber der oberen Schicht. Sehr interessant sind an gut durchgefärbten Stellen ungemein stark angeschwollene Formen, die im Innern die dunklen Körnchen tragen. Eigentümlich ist das Gerinsel, das offenkundig das Innere der Kolonien gedeckt. Auch an dünnen Stellen wird dieses Bild des Gerinsels deutlich sichtbar, es ist also kein Farbniederschlag oder dergl. Im Innern mancher Stellen des Präparats bemerkt man ein Unscharfwerden der einzelnen Sarcinen. Da, wo nur wenige Zellen im Gesichtsfeld blieben, sind die Bilder besser, aber auch hier ist das Unscharfwerden zu beobachten. Die hellglänzenden Sarcinamassen sind für dieses Präparat ebenfalls charakteristisch. Auch hier ist die große Seltenheit anomaler Formen hervorzuheben.

18 Stunden, Unterschicht, mit LiCl.

Auffallend ist auch hier das Gerinsel im Innern der Kolonien. Bei einigem Suchen findet man die winzigen Körnchen und die feinen Stäbchen wieder. Bemerkenswert sind negativ gefärbte ovale Gebilde, die das Aussehen von Zysten haben. Im allgemeinen aber sieht man dasselbe Bild wie auf dem entsprechenden vorigen Präparat.

Es ist also auch bei 18 Stunden ein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Reihen nicht vorhanden.

27 Stunden, Oberschicht.

Das Uebersichtsbild ist genau dasselbe wie bei dem Präparat von 18 Stunden. Auch auf der Platte war ein Unterschied nicht zu bemerken. Vereinzelt erscheinen lanzettförmige Gebilde, in denen gerinselte Körnchen lagern, die, wie zu erwarten, Much-positiv gefärbt sind. Desweiteren erscheinen große kuglige Formen, die man als Siegelringstadien deuten könnte, doch relativ sehr vereinzelt. Die hell glänzenden Sarcinen trifft man auch hier an, doch lange nicht so häufig.

27 Stunden, Oberschicht, mit LiCl.

Die Sarcinen sind sehr gleichmäßig gelagert. Man sieht außerordentlich wenig anomale Erscheinungen. Eigentümlich sind dunkel gefärbte Massen, die über die Sarcinen gelagert sind, und über deren Natur wir uns nicht im Klaren sind. Sehr selten sieht man die Körnchen an die Sarcinen angelagert. Die hell glänzenden Massen aus den vorigen Präparaten sind hier gänzlich verschwunden. An einigen Stellen sieht man kleine Körnchen in allen möglichen Teilungsstadien frei umherliegen. Es macht fast den Eindruck, als ob es Zwergformen der Sarcinen wären. Auffallend ist, daß in diesen Nestern normale Sarcinen überhaupt nicht vorkommen. Zwischen diesen Körnchen sind kleine Stäbchen sichtbar, die sich aus zahlreichen Körnchen zusammenzusetzen scheinen, sodaß sie ein rosenkranzartiges Aussehen haben.

27 Stunden, Unterschicht.

Es zeigt sich fast genau dasselbe Bild wie bei dem oberen Präparat. Die gleichmäßige Lagerung der Sarcinen ist auch hier charakteristisch und zeugt von einem durchaus normalen Wachstum. Die dunkel gefärbten Massen sind hier nicht sichtbar. Stäbchenformen sind sehr selten.

27 Stunden, Unterschicht, mit LiCl.

Es ist immer dasselbe Bild: auffallend wenig anomale Erscheinungen, desgleichen sehr wenig leere Hüllen. Einige „Amöben"-Formen mit schwarzen Körnchen darin sind sehr selten. Die vorher geschilderten dunkel gefärbten Massen sind auch hier verschwunden.

Von einem merklichen Unterschied zwischen beiden Reihen kann man demnach auch bei diesen Präparaten nicht reden.

32 Stunden, Oberschicht.

Ein Unterschied war im Wachstum der Sarcinen gegenüber den vorigen Platten nicht zu bemerken. Auf dem Präparat sieht man einzelne kuglig angeschwollene Formen, oft kettenartig hintereinander. Hin und wieder sieht man kurze, relativ dicke Stäbchen auftreten, in denen man die Körnchen ganz deutlich sieht. Daneben bemerkt man auch feine, rosenkranzförmige Stäbchen, doch alles äußerst selten. Einige Sarcinen sind deutlich von einem hellen Hof umgeben. An einer Stelle ist massenhaftes Auftreten freier Körnchen zu beobachten, sogar in verschiedenen Teilungsstadien.

Bei oberflächlicher Einstellung des Mikroskops erscheinen sie hell glänzend. Rings um diese Stelle sind die Sarcinen schwach gefärbt, inmitten dieses Nestes sind überhaupt keine mehr zu beobachten, wohl aber ein schwach-rosa Schimmer, wie von aufgelösten Sarcinamassen.

32 Stunden, Oberschicht, mit LiCl.

Die Sarcinen sind in dichten abgegrenzten Massen gelagert, die teilweise von dunkel gefärbten Massen überdeckt sind. Diese dunklen Haufen werden um so seltener, je weniger dicht die Sarcinen liegen. Man hat den Eindruck, als beständen diese dunklen Massen aus tief schwarz gefärbten Sarcinen. Aus welchem Grunde diese den Farbstoff so intensiv aufnehmen, bleibe vorläufig dahingestellt. Als Differenzierungsfehler sind diese sonderbaren Massen nicht anzusprechen, da sie sich scharf von den normalen Sarcinen abheben und fest umrissen sind, keinen verwaschenen Eindruck machen, wie dies bei schlecht differenzierbaren Formen der Fall ist. Von anderen anomalen Erscheinungen konnte in diesem Präparat außer einigen körnchenführenden Sarcinen trotz langen Suchens nichts beobachtet werden.

32 Stunden, Unterschicht.

An dichter gelagerten Stellen sind auch hier die dunklen Massen zu beobachten. Von abnormen Formen konnten wir hier ebenfalls so gut wie nichts sehen, nur an manchen Stellen traten verschwommene Bilder von Sarcinen auf, als wenn diese sich aufgelöst hätten. Stets zeichneten sich solche Stellen durch ihre schwache Färbung aus.

32 Stunden, Unterschicht, mit LiCl.

Die dunklen Massen treten an dichten Stellen ebenfalls auf. Äußerst selten sieht man feine Much-negativ gefärbte Stäbchen, in denen wiederum die positiv gefärbten Körnchen zum Vorschein kommen. Ferner sind einige groß angeschwollene Formen ebenfalls mit Körncheninhalt sichtbar. Diese Präparate weisen zwischen beiden Paralellreihen ebenfalls keinen besonderen Unterschied auf.

42 Stunden, Oberschicht.

An besonders dicht gelagerten Stellen sind die dunklen Massen wiederum sichtbar, wenn auch nicht mehr so zahlreich. Man bemerkt auch in diesem Präparat kettenartig hintereinander liegende große angeschwollene Kugelformen, oft aus drei bis vier

Stücken bestehend; sie erinnern lebhaft an Azotobactererscheinungsformen, wie sie von Wilke gefunden wurden. Durchmustert man Stellen, die durch zu dicke Lagerung schlecht entfärbt sind, so findet man diese merkwürdigen morphologisch veränderten Formen auch nicht häufiger, ein Zeichen, daß es sich nicht um Farbniederschläge handeln kann. Es kommen auch relativ breite Stabformen vor, in denen die bekannten Körnchen eingelagert sind. Manchmal liegen sogar zwei solcher Stäbchen beieinander.

42 Stunden, Oberschicht, mit LiCl.

In diesem Präparat fallen außer den auch hier auftretenden dunklen Haufen die bereits früher geschilderten rosenkranzförmigen Stäbchen auf. Diese erwecken den Eindruck, als ob sie zerfallen und dabei die schwarzen Körnchen entlassen. Weiterhin sieht man Stäbchen, bei denen die Körnchen noch nicht so deutlich hervortreten, immerhin aber sichtbar sind. Durch verschiedene Uebergangsformen kann man sehen, daß aus diesen letzteren Stäbchen durch Anschwellen der Körnchen die Rosenkranzformen entstehen. Deutlich sind einige Siegelringstadien sichtbar, sogar auskeimende mit den darin befindlichen Körnchen. Die auch im vorigen Präparat auftretenden großen Kugelformen sind hier gleichfalls zu sehen. Auf einem nach Heidenhain gefärbten Präparat erscheinen einzelne stark lichtbrechende Sarcinen, die bereits in den ersten Präparaten auftraten. Die starke Lichtbrechung ist, wie bereits erwähnt, wahrscheinlich auf besondere Inhaltsstoffe zurückzuführen. Hin und wieder erscheinen entweder ganz leere oder Körnchen führende Sarcinahüllen.

42 Stunden, Unterschicht.

Hier sieht man ebenfalls gut die Uebergänge von gewöhnlichen Stab- zu den Rosenkranzformen. Es finden sich weiterhin etwas unregelmäßig geformte Stäbchen, mehr keulige Form. Bei diesen „Keulen" sieht man deutlich, daß die Spitzen entleert sind; bei anderen sieht man, wie einzelne kleine Körnchen sich am hinteren Ende eines Keulenstäbchens ansammeln und dieses allmählich füllen. Teilweise sind richtige lange Fäden sichtbar, über die wir vorläufig noch nichts aussagen wollen, da wir erst auf eine Bestätigung in anderen Präparaten warten wollen. Einzelne große Kugelformen sind ebenfalls sichtbar, die sich stets durch ihren Körncheninhalt und durch ihre Größe auszeichnen, die etwa das 2- bis 3fache der normalen Sarcinen beträgt.

42 Stunden, Unterschicht, mit LiCl.

Die Sarcinen machen hier stellenweise einen verwaschenen Eindruck, als ob sie sich auflösen wollten. Die großen Kugeln sind wieder sichtbar, desgleichen große ovale Gebilde, die einen Kern zu besitzen scheinen. Oft sind die Sarcinen halbmondförmig deformiert. Hin und wieder trifft man einzelne Nester, in denen zahlreiche entweder ganz leere, oder Körnchen enthaltende Sarcinahüllen zu finden sind. In der Nähe solcher Nester fehlen nie deformierte Sarcinen, entweder die ovalen Gebilde oder die Kugelformen. Charakteristisch ist für dieses ebenso wie für die vorhergehenden Präparate die große Seltenheit, mit der solche Formen zu beobachten sind.

Wiederum läßt sich bei diesen Präparaten ein wesentlicher Unterschied nicht feststellen.

3 Tage, Oberschicht.

Für diese Präparate ist die geringe Größe der Sarcinen auffallend, was aller Wahrscheinlichkeit nach auf Nahrungsmangel zurückzuführen ist. Am Rande nämlich, wo die Sarcinen nicht so dicht lagern, erreichen diese ihre normale Größe. Bezeichnend ist aber, daß in den doch anscheinend geschwächten kleineren Formen die anomalen Erscheinungen auch nicht häufiger auftreten. Charakteristisch für diese Präparate ist das nesterartige Auftreten von Körnchen sowohl innerhalb wie außerhalb der Sarcinen, mitunter in großen Massen. Dagegen ist von anderen Erscheinungsformen, wie Stäbchen- und Kugelformen, nichts zu sehen. Die Sarcinen zeigen deutliche Vakuolen, die besonders in der Färbung nach Heidenhain gut zum Ausdruck kommen und sich durch ihre schwere Färbbarkeit auszeichnen. Wahrscheinlich lagern die Sarcinen in ihrem Innern besondere Reservestoffe ab

3 Tage, Oberschicht, mit LiCl.

Hier sind fast ausschließlich normale Sarcinen sichtbar, und erst nach langem Suchen gelingt es, die früheren Erscheinungen wiederzufinden. Besonders fallen die großen Kugelformen ins Auge, an besonders günstigen Stellen sieht man, daß diese oft kettenartig hintereinander liegen. Dadurch erhalten sie das Aussehen von Zystenbildungen. Sehr selten sieht man lange verzweigte Fäden, die in der Mitte angeschwollen sind. In den nach Much rötlich gefärbten Fäden sieht man Körnchen auftreten. Die dunklen

Massen, die noch im vorigen Präparat, wenn auch sehr spärlich auftraten, sind hier gänzlich verschwunden. Die Färbung nach Heidenhain läßt auch hier Vakuolen in den Sarcinen erkennen.

3 Tage, Unterschicht.

Auch in diesem Präparat fällt das nesterartige Vorkommen der Körnchen auf. Interessant ist es zu beobachten, daß diese Körnchen in verschiedenen Stadien vorkommen, von einzeln isolierten bis zu haufenartigen Ansammlungen, die direkt zu den vorher geschilderten und auch hier vorkommenden dunklen Massen hinüberführen, sodaß wir vielleicht die dunklen Haufen als dichte Ansammlungen von Körnchen aufzufassen haben. Merkwürdig ist auch hier das Auftreten von langen Fäden, die wir in fast allen alten Präparaten auftreten sahen, und die wir nun nicht mehr als bloße Zufallsbildung deuten können. Innerhalb dieser Fäden sieht man die Körnchen wieder, und es liegt nahe, diese in einen Zusammenhang mit den langen Fäden zu bringen.

3 Tage, Unterschicht, mit LiCl.

Die Körnchenbildung ist hier kaum zu beobachten. Das Präparat zeigt fast ausschließlich die normalen Sarcinen, abgesehen von den dunklen Massen, die hier wieder vorkommen, wenn auch nicht in so ausgesprochen großen Haufen. Es fehlen jedoch die Uebergangsstadien zu den Einzelkörnchen. Bei der Färbung nach Heidenhain treten sehr häufig die bereits erwähnten stark lichtbrechenden Zellen auf. Sie haben hier ein deutlich ringförmiges Aussehen, indem sie scharf umrandet sind und in der Mitte einen glänzenden Hof besitzen. Leere Sarcinenhüllen sieht man in gewissen Nestern massenhaft, oft sind ganze Pakete ungefärbt, meist aber sind eine oder mehrere Sarcinen tief schwarz gefärbt, und es macht den Eindruck, als hätte man auch hier mit den Körnchen zu tun, nur stimmen die Größenverhältnisse nicht überein, da diese dunklen Körper durchaus die Größe normaler Sarcinen besitzen. Es läßt sich den Beobachtungen nach also auch hier ein großer Unterschied zwischen den Reihen mit und ohne LiCl. nicht nachweisen.

4 Tage, Oberschicht.

Dieses Präparat zeigt nur sehr wenig von den bisher beschriebenen Erscheinungsformen. Die dunklen Massen fehlen auch hier nicht. Bei stärkerer Vergrößerung kann man hier an geeigneten Stellen beobachten, daß sich diese dunklen Massen in positiv

gefärbte Kugeln auflösen, was gut zu den vorher beschriebenen Uebergangsstadien paßt. Als große Seltenheit sind keulig angeschwollene Stäbchen sichtbar. Bei der Heidenhain-Färbung erscheinen auch hier die Sarcinen mit glänzendem Innenhof, wahrscheinlich haben wir es hier schon mit Dauerformen zu tun.

4 Tage, Oberschicht, mit LiCl.

Die seltenen abweichenden Erscheinungsformen sind hierfür charakteristisch. An manchen Stellen beobachtet man merkwürdige kleine dunkle Ringe, deren Inneres nach der Much'schen Farbmethode rot gefärbt ist. Daß diese Erscheinungsform nicht indentisch mit den Ringen der Heidenhain-Färbung ist, beweist das sehr seltene Auftreten gegenüber der letzteren. Man könnte sie eher für Siegelringstadien halten, wofür das Aeußere spricht, doch sind sie unserer Meinung nach zu klein dazu. Man könnte sie vielleicht als Glieder von Rosenkranzformen ansehen, zumal meist zwei bis drei solcher Ringe hintereinander liegen. Die dunklen Massen und leeren Sarcinahüllen erwähnen wir als Selbstverständlichkeit.

4 Tage, Unterschicht

Da sich dieses Präparat von dem entsprechenden oberen durch nichts unterscheidet, unterlassen wir die Beschreibung.

4 Tage, Unterschicht, mit LiCl.

Auch hier haben wir fast dasselbe Bild. Bemerkenswert sind nur einige große angeschwollene Zellen, die meist zu zwei beieinander und oft nesterartig zusammenliegen. Diese Serie von Präparaten zeigt demnach gleichfalls ein ziemlich übereinstimmendes Verhalten.

6 Tage, Oberschicht.

Bemerkenswert sind nesterartig auftretende Stellen, wo in der Hauptsache ungefärbte Sarcinen, also leere Hüllen vorkommen, ja teilweise trifft man Stellen, die nicht ein einziges Bakterium aufweisen. Bei genauerem Hinsehen bemerkt man die kleinen schwarzen Körnchen darin. Am Rande solcher Nester sieht man Uebergangsstadien von intakten Sarcinen zu leeren Hüllen. Auffallend sind ferner einige große, formlose Massen, die schwach gefärbt sind und im Innern mehrere Körnchen beherbergen. Man könnte versucht sein, diese Massen für miteinander verschmolzene Sarcinen zu halten, deren Zellgrenzen aufgelöst sind. Einige solcher Formen haben typische Amöbengestalt mit lappigen Pseudopodien, andere

besitzen ovale oder runde Gestalt, mitunter mit einem mehr oder weniger zentral gelegenen Kern, bei dem man in günstigen Fällen eventl. noch eine Art Nukleolus sieht. Bei genauem Durchsehen findet man diese Formen ziemlich häufig. Merkwürdigerweise sind hier die Sarcinen gleichmäßig intensiv gefärbt, ohne die für die vorherigen letzten Präparate charakteristische Innenhofbildung.

6 Tage, Oberschicht, mit LiCl.

Hier fällt ebenfalls die intensive Färbung der Sarcinen auf, wodurch diese den Eindruck erwecken, als wären sie frisch übergeimpft. Die amöbenartigen Formen treten auch hier in Erscheinung, wenn auch nicht in derselben Häufigkeit.

6 Tage, Unterschicht.

Auffallend sind hier manche Stellen, an denen sich fast nur größere, schwach gefärbte Formen vorfinden, die das Aussehen miteinander verschmolzener und aufgelöster Sarcinen haben. Vereinzelt sieht man die leeren Hüllen wieder, oft aber enthalten diese noch einen an einer Seite gelegenen intensiv dunklen Körper. Die Sarcinen selbst besitzen sowohl in ihrer Größe als auch Färbbarkeit die verschiedensten Uebergänge: man sieht einerseits relativ große, dunkel gefärbte Formen, andererseits aber sind sie sehr klein und meist schwach gefärbt. Aeußerst selten beobachtet man auch hier die schon öfter erwähnten Siegelringformen.

6 Tage, Unterschicht, mit LiCl.

Einige der Sarcinen zeigen hier noch die für die letzteren Präparate typische Innenhofbildung. Sonst bietet sich dasselbe Bild dar: die amöbenartigen Formen treten wieder auf, sehr selten auch die Siegelringformen, kenntlich an ihrer die normalen Sarcinen überragenden Größe, vor allem aber an der Ringform, deren eine Seite dunkel gefärbt ist und so das Aussehen eines Siegelringes annimmt. Man beobachtet stets, daß solche anomalen Erscheinungen nesterweise auftreten. Es zeigt sich danach also, daß in diesen Präparaten gleichfalls dieselben Erscheinungen auftreten.

9 Tage, Oberschicht.

Als Besonderheit treten hier unter den sonst vorwiegend normalen Sarcinen ganz hell gefärbte große Formen auf, die in ihrem Innern kaum eine Struktur erkennen lassen, am Rande

dagegen mehrere, oft sogar viele Körnchen aufweisen. Charakteristisch für dieses Präparat ist es, daß auffallend wenig vom normalen Typus abweichende Formen vorkommen. Ganz sonderbar ist hier die Färbung, die man nach der Heidenhain'schen Methode erzielt: das Innere der Sarcinen ist tiefschwarz, während die äußeren Partien hell gefärbt sind, sodaß um jede Sarcina ein Außenhof gebildet wird, also gerade umgekehrt wie bei den vorigen Präparaten, wo wir einen Innenhof auftreten sahen.

9 Tage, Oberschicht, mit LiCl.

Hier sind kaum einige anomale Formen zu sehen. Auffällig ist, daß die Sarcinen hier eine außerordentlich geringe Größe aufweisen. Merkwürdigerweise sind sie hier durchaus normal gefärbt, ohne jegliche Hofbildung.

9 Tage, Unterschicht.

Man sieht einzelne Siegelringe auftreten, auch die schon öfter erwähnten amöboiden Formen lassen sich nachweisen. Ferner beobachtet man wieder die leeren Sarcinahüllen. Oft sind in einem Sarcinapaket 2, 3 oder mehrere Bakterien inhaltslos, oft findet man aber auch Pakete, die nur aus leeren Hüllen bestehen. Die Färbung ist dieselbe wie bei dem entsprechenden oberen Präparat. Eigentümlich ist es, daß zwischen den beiden entgegengesetzten Hofbildungen ein gewissermaßen indifferentes Stadium auftrat.

9 Tage, Unterschicht, mit LiCl.

Es sind fast ausschließlich normale Sarcinen zu sehen, bis man plötzlich auf eine Stelle trifft, wo die Körnchen wieder in reichlicherer Menge auftreten. In der Umgebung solcher Nester kann man auch winzige Stäbchen beobachten, die dieselbe Färbung wie die normalen Sarcinen aufweisen, und über deren feinere Struktur man wegen der Kleinheit des Objektes nichts aussagen kann. Wie nach dem entsprechenden oberen Präparat zu erwarten ist, sind die Sarcinen auch hier normal, d. h. ohne Hofbildung gefärbt. Bei dieser Platte scheint sich also das indifferente Stadium länger erhalten zu haben. Sieht man von der Färbbarkeit ab, so läßt sich auch hier ein tiefgehender Unterschied in den einzelnen Präparaten nicht nachweisen.

14 Tage, Oberschicht.

Es ist immer wieder dasselbe Bild, das sich uns darbietet, und das durch die überaus große Regelmäßigkeit und Gleichheit der Formen charakterisiert wird. Nur noch selten treten die Körnchen auf, die bei oberflächlicher Einstellung des Mikroskops immer das typische helle Glänzen zeigen. Meist liegen diese Körnchen zu 2 bis 3 beisammen, als wenn sie sich eben geteilt hätten. Einzelne Siegelringformen sind, wenn auch äußerst selten, in hervorragender Deutlichkeit sichtbar. Die Färbung nach Heidenhain ergibt den zu erwartenden Außenhof.

14 Tage, Oberschicht, mit LiCl.

Es zeigt sich eine augenfällige Uebereinstimmung mit dem vorigen Präparat. Die Färbung zeigt hier noch zum großen Teil das indifferente Stadium, wenn auch schon verschiedene Außenhofbildungen auftreten.

14 Tage, Unterschicht.

Der Formenreichtum ist hier auf einige wenige Siegelringstadien beschränkt. Einzelne große, unregelmäßige, negativ gefärbte Massen halten wir für haftengebliebene Agarstückchen.

14 Tage, Unterschicht, mit LiCl.

Es bietet sich uns genau dasselbe Bild. Bei diesen Präparaten kann man von einem merklichen Unterschied ebenfalls nicht reden.

3 Wochen, Oberschicht.

Für die Sarcinen dieses Alters ist die schwere Färbbarkeit, als Ursache davon die Außenhofbildung charakteristisch. Es ist auffallend, wie wenig leere Hüllen gegenüber den früheren Präparaten hier auftreten. Die Sarcinen sind hier außerordentlich klein, sie machen einen etwas verwischten Eindruck, als ob ihre Zellgrenzen sich aufzulösen begännen.

3 Wochen, Oberschicht, mit LiCl.

Hier fallen besonders zwischen den kleinen, schlecht färbbaren Sarcinen große stark tingierte Formen auf. Aeußerst spärlich sind hier einige Siegelringstadien sichtbar, nesterweise findet starke Körnchenansammlung statt.

3 Wochen, Unterschicht.

Es ist fast ein genaues Abbild des entsprechenden oberen Präparates. Auffällig sind hier die schon früher erwähnten großen Zellen, die meist paarweise nebeneinander liegen. Einige Rosenkranzformen sind hier besonders schön zu sehen.

3 Wochen, Unterschicht, mit LiCl.

Man sieht hier gleichfalls das nesterartige Ansammeln von Körnchen. Eigentümlich sind einzelne zystenartige Formen, die kettenförmig hintereinander liegen und sich von den normalen Sarcinen durch ihre bedeutende Größe auszeichnen. Interessanterweise zeigen jetzt alle Präparate ohne Unterschied die typische Außenhofbildung. Damit dürften wohl alle Sarcinen zur Bildung von Dauerformen (Arthrosporen?) übergegangen sein. Alle diese Präparate zeichnen sich durch eine auffallende Aehnlichkeit aus und lassen jeden tieferen Unterschied vermissen.

Da auf den nächsten Präparaten stets dasselbe Bild erscheint, schließen wir die Beobachtungsreihe ab.

Literaturbesprechung.

Es würde zu weit führen, an dieser Stelle alle Literatur nochmals zu besprechen, da sie in den Arbeiten meiner Vorgänger schon behandelt worden ist. Dagegen halten wir es für unsere Pflicht, Arbeiten zu berücksichtigen, die uns als Botanikern schwerer zugänglicher waren und auf deren Bedeutung wir daher erst jetzt aufmerksam wurden. Eine überragende Stelle nimmt die an originalen Ideen reiche Schrift von v. Preiß[19]) ein: Die Bakteriophagie. Leider sind die Arbeiten durch die in der Bakteriologie übliche einfache Flammenfixation beeinträchtigt, ja wir möchten sagen, es ist schade, daß v. Preiß zu den letzten Folgerungen aus seinen fraglos richtigen Gedanken nicht kommen konnte. Er schreibt:

„Was mich besonders veranlaßte, Ursache und Wirkung auseinander zu halten, das war die Erkenntnis, daß in den Bereich der Bakteriophagie viele Erscheinungen gehören, die mit einer Auflösung nichts zu tun haben, wo man von Lysinen zu sprechen nicht berechtigt ist, die aber nichtsdestoweniger dieselbe Ursache haben müssen, wie die bakteriophage Auflösung", denn „das Wesen des Phänomens ist gewiß nicht die Auflösung der Bakterien, die ja blos eine der bakteriophagischen Erscheinungen darstellt". Seiner Ansicht, daß man — „solange wir so wenig Einblick in das Innere von Bakterien haben — eben die Eigenschaften ihrer Kolonien strenger beachten solle", führt ihn zu der Betrachtung der morphologischen Seite der Bakteriophagie. „Ist der Phage ein Mikrob, so kann er selbstverständlich wohl Erzeuger eines Lysins, nicht aber dieses selbst sein; aber es ist ebenso leicht möglich, daß das verdauende Enzym ein Erzeugnis der durch den Phagen erkrankten Bakterienzelle ist". „Heute

aber sehen wir in der Reihe der Erscheinungen der Bakteriophagie an Bakterien Vorgänge und Zustände, die sich sämtlich damit erklären lassen, was wir derzeit über Infektion, infektiöse Zustände, Vererbung, Immunwerden, Latenz von Keimen etc. wissen, und doch verhält man sich allgemein der parasitären Theorie gegenüber — wie ich glaube mit Unrecht — ablehnend, weil man den Parasiten noch nicht greifbar machen konnte. Es scheint sich zu wiederholen, was die Geschichte der Gärungen erfahren; man bestrebt sich, auch das Phänomen der Bakteriophagie mit Hilfe chemischen Wissens und Vorstellungen zu erklären. Und doch hat es keine Berechtigung, eine Bakterienzelle für viel zu klein zu halten, als daß in ihr fremde Kleinwesen Platz fänden; sie ist eine kleine Welt, in der gewiß kleinere noch Platz finden; weshalb sollten gerade sie geschützt sein gegen das Eindringen von Parasiten, denen sonst jede größere Zelle, jedes Lebewesen ausgesetzt ist. Ich möchte meine Meinung über die Natur des Phagen damit zusammenfassen, daß sich sämtliche Erscheinungen, die ich als in den Bereich der Phagenwirkung gehörend erkannt habe, vom Standpunkte der parasitären Theorie des Phagen restlos erklären und verstehen lassen". „Das Phänomen der Bakteriophagie besteht in Krankheitserscheinungen von Bakterien, folglich ist es an das Leben der letzteren gebunden; ein Parasit ist gleichfalls auf das Leben seines Wirtes angewiesen. Das ursächliche Prinzip der Bakteriophagie ist unbegrenzt fortzüchtbar, ebenso, wie alle Lebewesen; da jedoch seine Vermehrung nur in Gegenwart lebender Bakterien vor sich geht, ohne solche aber seine Fortzüchtung bisher nicht gelang, so kann es sich — wie d'Herelle annimmt — nur um ein obligat parasitisches Kleinwesen handeln. Alle Erscheinungen der Bakteriophagie finden im Rahmen einer parasitären Krankheit Platz". „Was immer das wirksame Agens sei, so viel scheint aus den in dieser Arbeit niedergelegten Angaben mit großer Wahrscheinlichkeit hervorzugehen, daß es kein einfach lösendes zersetzendes Ferment sein könne; es muß vielmehr etwas sein, was in den Stoffwechsel der Bakterienzellen einzugreifen, deren assimilierende und dissimilierende Tätigkeit zu stören vermag und vielleicht eben dadurch Anstoß zu seiner Vermehrung gibt. Die krankmachende Wirkung desselben ist das Wesentliche. Die Krankheit ist eine ganz eigenartige, spezifische, folglich muß auch das wirksame Agens die Lebensfunktionen der Bakterienzellen in einer ganz bestimmten Richtung schädigen". „Alle Deutungen, die das bakteriophage Prinzip aus Bakterien entstehen lassen, und wonach es durch Zerfall der letzteren frei werden müsse, um benachbarte Bakterienzellen angreifen zu können, sind mit der soeben angeführten Phagie allerjüngster Kolonien schwer vereinbar."

Die Phagie hat eine Inkubationszeit und wirkt erst nach 2—3 Stunden frühestens, meist mehr. Das tötliche Agens muß sich erst vermehren, um wirken zu können. Die unbegrenzte Vermehrungsfähigkeit läßt sich aber nur leicht mit der parasitischen Natur des Phagen erklären.

Wir gehen nun zu den Erscheinungsformen am Bakterium selbst über. „Ein infiziertes Bakterium kann am Leben bleiben und die verschiedensten krankhaften Veränderungen erfahren; es kann entarten und absterben; es kann den Parasiten enthalten und dennoch teilungsfähig

bleiben; es kann sich in eine infizierte und eine parasitenfreie Tochterzelle teilen; so können aus einem Bakterium gemischte Nachkommenschaften (Kolonien) entstehen, die aus Gruppen von gesunden und infizierten Bakterienzellen bestehen; der Parasit kann auch latent in Bakterienzellen vorhanden sein, um in folgenden Generationen der letzteren früher oder später sich vermehrend, vielleicht ganz unerwartet durch irgend eine phagische Erscheinung seine Gegenwart zu verraten."

v. Preiß weist die von den Herstellern des bakteriophagen Lysins vorausgesetzte Annahme, daß die angewandten Bakterien gesund waren, zurück, denn er hält es nicht für zweifelhaft, „daß es sich in allen solchen Fällen um Bakterien handelte, die mit dem ursächlichen Prinzip bereits behaftet gewesen waren".

Es sei nun noch kurz auf seine morphologischen Beobachtungen eingegangen. „Man gedenke ferner jener Bilder, die ich als die allergeringsten, noch sichtbar zu machenden Zeichen der Phagie beschrieben habe, nämlich innerhalb von Kolonien zwischen Bakterienzellen normaler Größe und Färbung einzelne zerstreute hypertrophische und dunkler gefärbte Bakterien und Gruppen von solchen; sie sind offenbar Träger des ursächlichen Prinzips, obgleich bei ihnen von einer Lyse keine Rede sein kann. Es können aber auch solche Kolonien das ursächliche Prinzip der Phagie bergen, an denen überhaupt garnichts Außergewöhnliches zu erkennen ist".

v. Preiß benutzte für seine Untersuchungen den Colibazillus, den er mit einem Phagen vom Stuhl eines Typhuskranken infizierte. Seine mit Carbol-Toluidin blau gefärbten Präparate zeigten eine „metachromatische Färbung in dem Sinne, daß alle nicht lytischen Kolonien oder Teile derselben blau, lytische dagegen rot oder rot-violett gefärbt erschienen; durch ihre rötliche Färbung verraten sich in solchen Präparaten allerkleinste Herde der bakteriophagen Lyse, auch solch mikroskopische, wo das Phänomen sich blos auf eine kleine Gruppe von Keimen beschränkt". „Die vollständig phagierten Kolonien, wie es die dem Vorgange bereits frühzeitig verfallenen zu sein pflegen, erscheinen in einem solchen Klatschpräparat lediglich als rötliche Wölkchen verschiedener Dichtigkeit. Diese rötlichen Massen sind wohl die Ueberreste, eigentlich Umwandlungsprodukte der aufgelösten Bakterienzellen". „Sie erscheinen flockig oder schollig, übrigens struckturlos oder sehr fein granuliert, oft mit gröberen Körnchen, zuweilen noch Bakterienzellen enthaltend von gleichfalls rötlichem Farbton". „Unvollständig gelöste Kolonien weisen in dieser rötlichen Grundsubstanz noch mehr oder weniger Bazillen auf, die zum Teil von normaler Größe und tiefblauer Färbung sein können, zumeist aber sich im Zustande hochgradiger Entartung befinden. Sehr häufig sind außergewöhnlich lange Bazillen, sowie sehr lange, zierlich geschlängelte Fäden oft noch in Haarbüscheln ähnlichen Bündeln aneinanderliegend."

Die Uebereinstimmung der hier beschriebenen Erscheinungen mit den von uns bei Sarcinen gefundenen Formen ist zumindest auffallend. Weiterhin erwähnt er in vollkommen phagierten Kolonien das Auftreten von stärker lichtbrechenden Bakterienprodukten, die ein „fein durchlöchertes

Aussehen zu erkennen" geben; auch hier drängt sich uns der Vergleich mit unseren hell glänzenden Sarcinenballen auf. In allerjüngsten Phagennestern beobachtet er folgende Veränderungen an den Bakterien: „Ein Dicker- und Längerwerden, Auswachsen zu kürzeren oder längeren Fäden, ein Aufquellen zu großen kokkenförmigen Kügelchen". Wir dürften wohl nicht fehlgehen, diese aufgequollenen Formen mit unseren Amöbenformen zu indentifizieren. Die gequollenen und verlängerten Fäden und Bakterien weisen rötlich gefärbte Abschnitte auf, „und zwar so, daß der größte mittlere Teil der Bazillen rötlich, deren Pole dagegen blau gefärbt erscheinen". „Verfallen jedoch die Bakterien nicht rasch der Auflösung, sondern bleiben sie aus irgend einem Grunde längere Zeit lebend der Phagenwirkung ausgesetzt, so können sie die mannigfaltigsten Veränderungen erfahren. Es ist lediglich eine Frage der Zeit, ob sie weitgehende Veränderungen erleiden oder nicht; läßt sie das wirksame Prinzip — sei es ein Gift, Ferment oder ein Parasit — längere Zeit am Leben, so können sie unter dessen Einfluß weitgehende Entartungen erleiden, wenn nicht, so müssen sie ohne solche untergehen. Man könnte dies auch mit den Worten ausdrücken: Ist ber Prozeß ein akuter — sei es infolge großer Wirksamkeit des Phagen oder großer Disposition der Bakterien — so bleibt den letzteren wenig Zeit zur Entartung; verläuft jedoch der Prozeß chronisch, so ist eine tiefer greifende Entartung wohl möglich." „Sowohl gequollene wie phagenförmige Entartungsformen können inmitten ganz normal aussehender Bakterien auftreten". Der Autor betont dann noch, daß „gewisse Inhomogenitäten" auch bei „normal geltenden, mit dem Phagen nicht behandelten Bakterien zu beobachten sind", und sagt dann weiter: „Nichts ist jedoch leichter möglich, als daß solche als normal geltende Bakterien schon von Haus aus mit den Phagen vermengt und sie dessen Wirkung bereits vorher kurz oder lang ausgesetzt gewesen sind oder ihn noch immer enthalten."

Bemerkenzwert ist noch eine unlängst erschienene Arbeit von Gibson[30]), der den Lebenszyklus von Bacillus radicicola beschreibt. Auch dieser auf Löhnis fußende Forscher kommt zu für uns höchst wertvollen Ergebnissen, indem er gleichfalls verschiedentlich das Auftreten von Körnchen innerhalb der Bakterienzellen erwähnt. Er schreibt: „Cultures of B. radicicola may be found in which the cells on mannite agar are very unlike the usual rod-shaped bacteria even during the first hours of growth on a fresh medium. In such cultures the cells, which are frequently irregularly spherical, ovoid or wedge-shaped, may be completely unstainable or may only show a faintly stainable granule; or faintly stained or granular rod-shaped structures may be contained within unstainable capsules. At times nothing stainable within the capsules can be recognised. These capsules are quite distinct from the usual slime in which the rods are always embedded for the slime takes the stai with avidity. Thread-like growths consisting of a series of faintly stainable granules enclosed in capsular material are common in cultures of this type." Diese Ergebnisse sind durch verhältnismäßig einfache Färbungen erzielt. Gibson hat zum Teil Flammenfixierung und Fuchsin genommen, dagegen fixierte er bei besonderen Fällen nach der Dobell'schen Tropfen-

methode mit Formalin und Alkohol und färbte mit indischer Tinte (Hämatoxylin) und Congorot. Weiterhin treten in seinen Kulturen verzweigte Formen auf, die gleichfalls die Körnchen enthalten: „By examining cultures exhibiting all stages of branching it may be seen that the initial bud and later the tip of the branch frequently contains one of the deeply staining granules which are common in cells undergoing this process". Schließlich beobachtet er kugelige, körnchenführende Formen, die er nach Löhnis als Gonidangien bezeichnet: „The spherical forms usually contain very minute, deeply staining granules" und fügt noch hinzu, daß „the granules were very clearly defined under the microscope".

In einer Abhandlung über die Natur des Bakteriophagen beschäftigt sich Flu[21]) mit den d'Herelle'schen Kriterien, die dieser für ein lebendes Prinzip der Bakteriophagie in physiologischer Hinsicht aufgestellt hat und gelangt zu folgenden Punkten:

1. Der Bakteriophag zeigt die Erscheinung der Autonomie, da er bei Vermehrung in einem heterogenen Medium seine Eigenschaften behält.
2. Da ein lebendes Wesen nur durch Assimilation hierzu befähigt ist, folgt daraus, daß auch der Bakteriophag assimilieren kann.
3. Der Bakteriophag kann sich innerhalb gewisser Grenzen an bestimmte Lebensbedingungen anpassen.
4. Bei beliebiger Zahl aufeinanderfolgender Impfungen ist der Bakteriophag imstande, sich als selbständiger Stoff zu behaupten, er kann sich also vervielfältigen.
5. Der Bakteriophag hat nicht gegen jedes Bakterium die gleiche Wirksamkeit, er ist spezifisiert.

Auf Grund der verschiedenen Arbeiten, die bei uns in dieser Hinsicht geführt worden sind, sind wir imstande, zu diesen physiologisch bedingten Kriterien entsprechende morphologische an die Seite zu stellen:

1. Wiedererzeugung der Erscheinungsformen.
2. Es findet ein Ausfressen der Bakterien statt.
3. Beim Eintrocknen und Verbrauch der Bakterien macht sich eine Abänderung des Bakteriophagen-Kreislaufs bemerkbar: bei Zusatz von LiCl sind die Erscheinungsformen manchmal häufiger, aber meist ähnlich.
4. Bei aufeinanderfolgenden Impfungen findet eine Vervielfältigung der Körnchen statt.
5. Trotz Aehnlichkeit der Erscheinungsformen sind gewisse Unterschiede bei den einzelnen Arten vorhanden, es ist also eine Spezifität bemerkbar.

Den Einwand Flu's, daß man die Gegner der Parasitentheorie nicht eher überzeugen kann, bis man eine Eigenschaft des Bakteriophagen gefunden hat, „die mit der Lysis nicht direkt etwas zu tun hat, und wenn man nicht nachweisen kann, daß auch diese Eigenschaft bei Vermehrung in heterogenem Milieu konstant bleibt, und der Bakteriophag auch in dieser Eigenschaft variieren und sich adaptieren kann", können wir entkräften, indem wir die Gestalt des Bakteriographen als die gesuchte Eigenschaft hinstellen. Insbesondere durch die Arbeit von Wilke ist bewiesen, daß der Bakteriophag in seiner Gestalt sich den verschiedensten

Bedingungen anpassen kann. Nur durch die Vernachlässigung dieses Momentes ist es zu verstehen, daß Flu in seinen zweifellos richtigen Gedankengängen nicht zum endgültigen Schluß gelangt, indem er den Bakteriophagen für ein ultramikroskopisches lebendes Wesen, einen „Parasiten der Bakterien" hält.

Zu der Arbeit von Tiomkin-Schukoff und Marg. Rittner[22]) wollen wir ebenfalls kurz Stellung nehmen. Die beiden Autoren behandelten Kulturen von Shiga-Bazillen 48 Stunden lang mit konzentriertem Glycerin bezw. 50%iger Glycerinbouillon. Dabei zeigte sich, daß zwar einige Keime der Bazillen noch festgestellt werden konnten, aber keine Lysinbildung auftrat. Unserer Theorie nach ist die auch zu erwarten gewesen, denn der Phage braucht zu seinem Fortkommen unbedingt lebendes Material, ein Parasit ohne seinen Wirt ist nicht lebensfähig. Bei Glyzerinzusatz begünstigen wir anfänglich das Phagenwachstum, ebenso wie in den meisten Fällen durch Zusatz von LiCl. Werden die Bakterien aber allzu sehr geschwächt, so kann sich der Parasit nicht weiter ausbreiten, es bleiben zum Schluß nur noch einige besonders resistente Bakterien über. Durch jeden schädigenden Einfluß stören wir das Gleichgewicht Bakterien : Phagen, anfänglich zugunsten der Phagen. Wird aber die Schädigung zu stark, so kann sich das Verhältnis umkehren.

In demselben Sinne ist auch die Arbeit von Ebert und Peretz[23]) zu deuten. Die beiden Autoren verfütterten Bacillus enteritidis Gärtner und den daraus gezüchteten Bakteriophagen an weiße Mäuse und versuchten, eine Schutzwirkung des Bakteriophagen festzustellen. Das Mißlingen dieses Versuches ist gleichfalls darauf zurückzuführen, daß ursprünglich das Gleichgewicht Bakterien : Phagen sehr zugunsten der Phagen gestört wurde, wodurch ein rasches Absterben der meisten Bakterien und damit auch der Phagen erfolgte. Auf die Dauer jedoch läßt sich das Gleichgewicht ohne weitere Eingriffe nicht stören, sodaß es sich bald von selbst wieder einstellt. Interessant ist noch die Angabe, daß die beiden Autoren bei einigen Danyß-Stämmen einen „körnigen Wuchs" bemerkten.

Tichomir V. Simié[24]) gibt in einer Arbeit an, daß er aus dem Blut akuter Typhusfälle Bakterien isolierte, die sehr häufig „Involutionsformen" zeigten und auf gewöhnlichem Agar sich sehr schlecht vermehrten, erst auf Blutagar ein besseres Wachstum zeigten. Unserer Ansicht nach handelte es sich um stark von Phagen befallene Stämme, die nur bei äußerst günstigen Medien ein überwiegendes Bakterienwachstum zeigten, in anderen Fällen aber einfach von den Phagen aufgefressen wurden. Der Autor machte weiter den sehr interessanten Versuch, durch fortgesetztes Ueberimpfen der Bakterien schließlich ein bakteriophagenfreies Material zu züchten, was ihm auch angeblich gelang: „Auf diese Weise erzielten wir schon nach 20 bis 25 Uebertragungen besonders auf Blutagar vollständig bakteriophagenfreie Bakterien. Dabei und noch ausgeprägter bei späteren Züchtungen erhielten wir die interessante Erscheinung, daß in ein und derselben Kultur die Bakteriophagen ungleich verteilt sind. Während einige Stellen reich an Bakteriophagen waren, fanden sie sich an anderen spärlich oder garnicht. Dies spricht unzweifelhaft für die belebte Natur der Bakteriophagen, die, wie auch andere

Mikroorganismen ihre Kolonien bilden, die in gemischten Kulturen ungleich verteilt sind." Es ist unserer Ansicht nach sehr wohl denkbar, daß durch fortgesetztes „Plattenwaschen" das Gleichgewicht Bakterien : Phagen schließlich sehr zugunsten der Bakterien gestört wird, indem die Bakteriophagen einfach „ausgewaschen" werden. Doch möchten wir ein vollständiges „Auswaschen" bezweifeln. In ähnlichem Sinne mögen auch die Reinigungsverfahren bei unserer Sarcinakultur gewirkt haben.

In einem Referat behandelt Demeter[25]) die bisherigen Arbeiten über das Wesen und die Natur der Bakteriophagie und kommt zu folgenden Ergebnissen: „Das lytische Prinzip steht in engsten Beziehungen zu den von ihm zerstörten Bakterien Seine Entstehung und Fortführung ist unmittelbar an lebende, sich vermehrende Bakterien gebunden". „Dabei können neue resistente Bakterienrassen (Variationen oder Mutationen) entstehen, die sich von den Originalkulturen wesentlich unterscheiden. Der Fortgang der Lyse läßt sich auch mikroskopisch verfolgen, wenn auch nicht in allen Fällen. Die Bakterien verlieren ihre normale Färbbarkeit, es treten charakteristische Veränderungen der äußeren Gestalt auf. Sie quellen zu schlecht färbbaren, kugeligen oder keulenförmigen Gebilden auf, die dann in feinste Körnchen zerfallen und verschwinden". Weiterhin entnehmen wir dieser Arbeit die von Bail aufgestellte Splittertheorie: „Unter dem Einfluß besonders der Körpersäfte würden die Bakterien in einzelne Splitter gespalten; die Splitter selbst bedürften zu ihrer Ernährung wieder Stoffe aus den noch lebenden übrigen Bakterien. Diese würden dadurch wiederum zu jenen auch für sich allein lebensfähigen Splittern abgebaut. Die Splitter sollen nun nach Bail aus Chromatinteilen der Bakterien stammen, als funktionell tätig gebliebene Teilchen der Bakteriensubstanz, die unter Verlust ihrer aufbauenden Tätigkeit nur mehr die zerstörende behalten haben. Nur wenn sich die Bakterienzelle im Wachstum befindet, ist das abgesplitterte bakteriophage Chromatin in der Lage, die gesunde Bakterienzelle zu infizieren und diese ihrerseits wieder zu veranlassen, Splitter abzugeben". Es fordert geradezu heraus, diese chromatinhaltigen „Splitter" mit unseren beobachteten Körnchen gleichzusetzen, um eine eindeutige Uebereinstimmung mit unserer Arbeit zu erzielen.

Auf einem anderen Wege versuchte Wohlfeil[26]) dem Problem der Bakteriophagie näher zu kommen. Er untersuchte die Atmungsintensität an dem Verbrauche von Sauerstoff und der Erzeugung von Kohlensäure bei Bakterien, die mit wirksamem und sterilem Lysin geimpft waren. Durch die Gegenwart von wirksamem Lysin weisen die Bakterien einen relativ hohen Sauerstoffverbrauch auf. Wir entnehmen seiner Arbeit folgende Daten: $254 \cdot 10^6$ Bakterien pro ccm mit wirksamem Lysin geimpft, ergeben einen O_2-Verbrauch von 44,6 ‰ und eine CO_2-Erzeugung von 6,0 ‰ in der Zeit von zwei Stunden. Mit sterilem Lysin geimpfte Bakterien dagegen ergaben in der gleichen Zeit bei $1560 \cdot 10^6$ Bakterien pro ccm einen O_2-Verbrauch von 54,5 ‰ und eine CO_2-Erzeugung von 7,63 ‰. Trotzdem also in letzterem Falle die Bakterienzahl pro ccm das 6fache übertraf, war der O_2-Verbrauch nur wenig größer. Das Entsprechende gilt auch von der CO_2-Produktion. Durch diese Versuche gelangt Wohlfeil zu dem Schluß, „daß die Bakterien durch das Lysin eine Stoffwechsel-

steigerung erfahren müssen", und zwar erklärt er diese durch den O_2-Verbrauch zerfallender organischer Substanz. Ein anderer Versuch bestätigt diesen Schluß noch besser: 1,48 · 10^9 Bakterien pro ccm mit wirksamem Lysin verbrauchen in 3 Stunden 10 Minuten 57,2 ‰ Sauerstoff und erzeugen 16,5 ‰ Kohlensäure. Dagegen verbrauchen 3,9 · 10^9 Bakterien pro ccm mit sterilem Lysin der gleichen Zeit nur 53,0 ‰ Sauerstoff und erzeugen 14 ‰ Kohlensäure „Diese Tatsachen zeigen, daß erstens in Uebereinstimmung mit früheren Feststellungen d' Herelles eine Keimverminderung durch das Lysin trotz ausbleibender Auflösung der Bakterienleiber bestand, zweitens daß aber die nicht mehr entwicklungsfähigen Keime noch geatmet haben müssen. Auch hier geht der respiratorische Quotient den Aenderungen des Stoffwechsels der tatsächlich atmenden Bakterien weitgehend paralell". „Diesen Schlußfolgerungen gegenüber wäre folgender Einwand berechtigt: Der gefundene relativ hohe O_2-Verbrauch im Stadium der Bakterienauflösung und der hier im Stadium des Fehlens der Lyse beobachtete beruhe nicht auf einem O_2-Verbrauch durch die zugrunde gegangenen Zellen, sondern auf einer Atmung des Lysins, welches in diesem Stadium in seinem Titer bereits sehr hoch gestiegen ist" Er sucht nun die lebende Eigenschaft des Lysins dadurch zu widerlegen, daß er bakterienfreies Lysin in seiner Atmung untersucht und keine findet. Daß er da Dauerformen der Erreger hatte oder bestenfalls haben konnte, bedenkt er nicht. Wir wissen, daß die Phagen nur solange vegetativ leben, als lebendige Bakterien vorhanden sind. Der Atemverbrauch im latenten Leben ist bekanntlich sehr gering. Daß Pockenvirus nach Zerreiben atmet, besagt nicht viel, denn einerseits werden durch solche mechanischen Einflüsse vielleicht die Zellen oder Teile derselben angeregt oder aus dem latenten Leben erweckt. Die Uebertragung des letzten Befundes auf Bakteriophagen ist zudem unstatthaft; ferner sind die Differenzen zwischen totem und wirksamem Virus hierbei so gering, daß der Verdacht auf Versuchsfehler sehr nahe liegt. Auf Grund seiner Versuche kommt er nun zu folgender Zusammenfassung: „Gasstoffwechselversuche an Bakterien zusammen mit Lysinen ergaben teils ein Parallelgehen der CO_2- und O_2-Werte mit den Keimzahländerungen, zum Teil jedoch neben der Stoffwechselschädigung eine relative Erhöhung des Bakterienstoffwechsels durch das Lysin. Unter Einwirkung des Lysins wurden die durch das Plattengußverfahren festgestellten Bakterienzahlen stets vermindert gefunden". „Nach der hier zur Anwendung gekommenen Methode steht es fest, daß das bakteriophage Lysin relativ zu den Kontrollen und einem untersuchten bekannten filtrierbaren Virus eine messbare Atmung nicht aufweist. Diese Tatsachen lassen zum mindesten an der Theorie von der Lebenstätigkeit des Bakteriophagen erhebliche Zweifel aufkommen, wenn sie diese Anschauung nicht sogar als unrichtig kennzeichnen." Wir möchten im Gegenteil glauben, daß gerade die Erhöhung des Stoffwechsels zum Teil auf die Phagen und die Bakterien zurückgeht. Die Bakterien sind nicht nur atmungsfähig geblieben, sondern die Phagen addieren sich noch zur Bakterienatmung.

Zusammenfassung.

Wir haben bei Sarcina flava Erscheinungen beobachten können, die man, ganz neutral ausgedrückt, als Pleomorphismus bezeichnen kann. Die Sarcinen sind in ganz jungen Präparaten noch nicht immer als typische Paketformen vorhanden, sondern vielfach noch als Einzelkokken, Diplokokken oder Viererformen. Bald jedoch bemerkten wir das Auftreten der typischen Sarcinaform. Die einfacheren Glieder sind durch große Einzelzellen ausgezeichnet. Es kommt dann zur Bildung von 16- und 32iger Stadien. Diese zerfallen dann für gewöhnlich. Bei der Fortentwicklung werden die Einzelzellen immer kleiner. Nach einiger Zeit bemerkt man, daß die Zellen sich etwas voneinander abheben. Sie bekommen im Innern einen hellen vakuolenartigen Hof. Dieser färbt sich nach Heidenhain nur sehr schwer. Endlich verdichtet sich der Inhalt und wir bekommen Sarcinen mit stark lichtbrechendem Außenhof. Diese Formen verändern sich nicht mehr, sie sind besonders für alte Kulturen kennzeichnend. Sie stellen eine Art Dauerform dar. Wenn wir wollen, können wir sie als Arthrosporen bezeichnen.

Neben diesen ganz im Rahmen der Sarcinaentwicklung vorhandenen Formen haben wir wesentlich anders geartete Gestaltungen. Diese erscheinen nicht allzu reichlich, besonders bei weitgehend durch Plattenguß gereinigten Kulturen. Eine Zugabe von Lithiumchlorid war nicht imstande, die Formen zu vermehren. Ebensowenig häuften sie sich bei einer weißen Variation, die innerhalb unserer Kulturen wie eine „Sektorialchimäre" auftauchte. Bereits in dem Ausgangsmaterial waren andere Formen vorhanden, die sich als bedeutend größer erwiesen und sich durch ovale Gestalt auszeichneten. Sie waren immer einzeln und nicht in Sarcinenform gelagert. Diese lösten beim längeren Liegen auf der Platte ihre Wanduug und gaben Gebilde, die in ihrer Unregelmäßigkeit etwas an Amöben erinnerten. In ihrem Inneren waren kleine nach Much stark färbbare Körnchen. Diese lösten sich aus dem Amöbenverbande. Zum Teil verwandelten sie sich in winzigste Stäbchen, die wir eigentlich richtiger als feinste Striche bezeichnen können. Auch diese enthielten immer die Körnchen und zerfielen in solche. In den Präparaten sind diese Körnchen an den Sarcinen liegend zu sehen, doch konnte ein Eindringen nicht mit absoluter Sicherheit festgestellt werden. Weiterhin beobachtet man genau dieselben

Körnchen innerhalb der Sarcinen. Es war häufig nur eine einzige Zelle eines Paketes, die einen solchen nach Much tiefschwarz gefärbten Inhalt führte. Daneben finden wir auch Sarcinen, die in mehr als in einer Zelle solche Körner führen. Es sind auch Typen zu finden, bei denen eine Zelle leer ist und daneben die anderen Zellen mit schwarzen Körnchen belegt sind. Die Körnerformen liegen häufig, aber nicht immer in mehr oder minder großen Nestern beisammen. Oft konnte man beobachten, daß mehr als ein Körnchen in einer Zelle lag. Es konnten etwa bis 8 sein. In gut fixierten Präparaten war das Aufgehen der Zellen und Hinausgehen von Körnern aus der Zelle zu beobachten. Besonders in Heidenhain-Präparaten, aber auch bei Vitalfärbung, ist das Vorkommen von leeren Hüllen von Sarcinagestalt auffällig. Löcher in denselben ließen sich nicht absolut deutlich nachweisen, wenn auch wahrscheinlich machen.

Aus den Zellen können nun entweder mehrere Körnchen herausgehen, oder es können auch feinste Stäbchen sein, die dann zunächst in Nestern, später auch vereinzelt zu beobachten sind. Diese Stäbchen waren nur selten in Vereinigung zu sehen. Es ließ sich deutlich ein Anschwellen dieser Stäbchen zu Keulenformen beobachten, daneben jedoch auch ein Zerfall zu kleinsten Körnchen. Weiterhin treten aus den Zellen deutlich größere Keulenformen aus, die sich bald amöbenartig aufblähen. Diese sind auf das sicherste mit einem Körnchen und einer dichteren Masse darum versehen. Das Ganze hat eine gewisse Aehnlichkeit mit einem Kerne. Die Amöben vereinigen sich zu etwas größeren Formen. Eigentliche Symplasmen größeren Umfanges fanden wir nicht. Die Amöben enthielten zunächst dunkle Körnchen, später war eine deutliche starke Wand und eine zentrale Vakuole zu sehen. Es sind das die Siegelringformen, von denen wir den Ausgang nahmen. Nur sehr selten, aber immerhin mehrmals beobachten konnten wir größere Stabformen. Diese waren bedeutend länger als die Sarcinazellen. Sie enthielten besonders an einem Ende die erwähnten Körnchen, an der Spitze waren sie häufig muchnegativ gefärbt. Aus ihnen kann man ebenfalls unter knotigen Zwischenformen Siegelringe entstehen sehen.

Am Schlusse dieser Arbeit möchte ich nicht verfehlen, Herrn Professor Dr. Mez für das Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte, meinen besten Dank auszusprechen. Ebenfalls drängt es mich, meinem Lehrer, Herrn Dr. Ziegenspeck, den

Dank für die mir bereitwilligst zur Verfügung gestellten teuren Instrumente mit Apochromatoptik und mikrophotographischen Apparate auszusprechen. Leider ist es mir nicht möglich, die Bilder in der Ausdehnung zu veröffentlichen, wie es für die Objektivität der Beweisführung wünschenswert wäre.

Literatur.

1. Koch Max: Die Kuhn'schen Bakteriophagen. Mez. Arch. Bd. 19, 1927. —
2. Fliegel: ineditus.
3. Wilke: Ueber die Formenfülle in Kulturen von Azotobakter chroococcum. Mez. Arch. Bd. 30, 1930. —
4. Borm: Die Wurzelknöllchen von Hippophäe phamnoides und Alnus glutinosa. Mez. Arch. Bd. 31, 1931.
5. Rammelsberg: Beitrag zur Kenntnis des Chitins der Pilze und Krabben. Mez. Arch. Bd. 32, 1931.
6. Harder: Beiträge zru Kenntnis der Nitrifikation. Mez. Arch. Bd. 31, 1931.
7. Kuhn: a) Bericht über die 10. Tagung des deutschen Vereins für Mikrobiologie: im Zentr. Bl. für Bakt., 1. Abtlg., Bd. 93.
   b) Demonstration der Ergebnisse morphologischer Bakterienstudien und zum d'Herelle'schen Phänomen. Im Arch. für Schiffs- und Tropenhygiene, Bd. 30, Beiheft 1.
   c) Bericht über den Stand der Untersuchungen über die verschiedenen Erscheinungsformen einer Bakterienart, in Mediz. Klinik, Jg. 1929 Nr. 35.
8. Löhnis: Zur Morphologie und Biologie der Bakterien. Im Zentr. Bl. für Bakt., 2. Abtlg., Bd. 56, Nr. 23/24.
9. Almquist: Biologische Forschungen über Bakterien. 1925.
10. Enderlein: Bakterien-Zyklogenie. Berlin 1925.
11. K. B. Lehmann und Neumann: Kurzes Lehrbuch der Bakteriologie. 2. Aufl., München 1896
12. Schmidt-Kehl: Der Formwechsel der Sarcinen, im Arch. f. Hygiene und Bakt. Bd. 103.
13. Goodsir: Edinb. med. and surg. Journal 1842, April.
14. Lehmann und Neumann: Bakteriologische Diagnostik. 7. Aufl., München 1927. Bd. I und II.
15. Meyer Arthur: Zentr. Bl. für Bakt., 1. Abtlg., Bd. 31, 1902.
16. Ellis: Zentr. Bl. für Bakt., 1. Abtlg., Bd. 33, 1902.
17. Matzuschita: Zeitschr. für Hygiene. 35, 495. 1900.
18. Smit: Die Gärungssarcinen, in Kolkwitz'sche Sammlung für Pflanzenforschung, Heft 14, bei Fischer in Jena. 1930.
19. v. Preiss: Die Bakteriophagie, bei Fischer in Jena 1925.
20. Gibson: Observations on B. radicicola, Beijk., in The Journal of Agricultural Science. Volume 18, Part. I, January 1928.
21. Flu: Die Natur der Bakteriophagen. Zentr. Blatt für Bakt., 1. Abtlg., Bd. 113, Heft 3—4.

22. Tiomkin-Schukoff und Marg. Rittner: Zur Frage der Fortführung eines bakteriophagen Lysins mit abgetöteten Bakterien. Zentr. Bl. für Bakt., 1. Abtlg., Bd. 114, Heft 1—2.
23. Ebert und Peretz: Zur Frage des Bakteriophagen des Bac. enteritides Gärtner und B. Danyß. Zentr. Bl. für Bakt., 1. Abtlg., Bd. 115, Heft 1—2.
24. Tichomir V. Simié: Die Rolle des Bakteriophagen bei der Bildung von Bakterienvarianten in pathologischen Produkten, Zentr. Bl. für Bakt., 1. Abtlg., Bd. 115, Heft 1—2.
25. Demeter: Bakteriophagie und Landwirtschaft, in Fortschr. der Landwirtschaft, 3. Jg., 1928.
26. Wohlfeil: Experimentelle Beiträge zur Theorie der bakteriophagen Lyse, in Zeitschr. für Hygiene, Bd. 108, Heft 4, 1928.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Berichte des naturwiss. Vereins für Schwaben, Augsburg

Jahr/Year: 1931

Band/Volume: 49

Autor(en)/Author(s): Klimmek Fritz

Artikel/Article: Ueber den Pleomorphismus bei Sarcina flava 99-133