

Zur Farbstoffproduction des *Bacillus pyocyaneus*.

Von

Dr. Anton A. Christomanos
in Athen.

Das auffällige Phänomen, dass eine gelbliche, grünlich fluorescirende Bouilloncultur des *Bacillus pyocyaneus*, die ich aus dem Exsudate eines mit acuter eiteriger Gonitis behafteten jungen Mannes erhielt, beim Schütteln plötzlich eine bläulich-smaragdgrüne Farbe annahm, bewog mich, die Ergebnisse der ausführlichen Arbeit von K. Thumm¹, nach welcher alle fluorescirenden Bakterien, unter anderen auch der *Bacillus* des blauen Eiters, nur einen gelblichen aber keinen blauen Farbstoff produciren sollten, einer abermaligen Prüfung zu unterziehen.

Thumm behauptet nämlich, dass die verschiedenen Färbungen der Culturen dieser Bakterienarten auf einen einzigen gelben Farbstoff zurückzuführen sind, dessen concentrirte, wässrige Lösung orange-gelb, die verdünnte gelb ist. Beide Lösungen fluoresciren blau. Die blaue Fluorescenz kann aber durch Zusatz eines Alkalis in eine grüne übergehen. Diese Veränderung geht auch thatsächlich vor sich, wenn die dazu nöthige Alkalimenge allmählich von den Bakterien selbst erzeugt wird, und bekanntlich sind alle fluorescirenden Bakterienarten durchweg Alkalibildner. Die anfänglich vorhandene blaue Fluorescenz geht somit, durch Einwirkung des Alkalis auf den gelben Farbstoff, in eine grüne über, und aus dieser Einwirkung, nicht aus dem Vorhandensein mehrerer Farbstoffe, wie bisher angenommen wurde, will nun Thumm die verschiedenen Färbungen der Culturen dieser Bakterien im Allgemeinen und die des *Bac. pyocyaneus* insbesondere erklären.

¹ K. Thumm, *Beiträge zur Biologie der fluorescirenden Bakterien*. Karlsruhe 1895.

Während nun Nägeli¹, Ledderhose², Kunz³, Ernst⁴, Girard⁵, Gessard⁶ und mehrere andere Autoren den beim Schütteln einer Bouillon-cultur des Bac. pyocyaneus auftretenden blauen, in der gelblichen Bouillon jedoch grün erscheinenden, Farbstoff aus der Oxydation einer in den Culturen enthaltenen Leukosubstanz durch den Luftsauerstoff zu Pyocyanin ableiten, behauptet Thumm, dass bei dieser Gelegenheit nur eine grüne Fluorescenz aufzutreten pflegt. Das ausschliesslich an der Oberfläche gebildete Alkali (Ammoniak) vertheilt sich beim Schütteln in der ganzen Cultur und wirkt, im oben erwähnten Sinne, auf den gelben, ebenfalls an der Oberfläche gebildeten, rascher jedoch als das Alkali in die Tiefe dringenden Farbstoff ein. Er widerspricht demnach allen über die Farbstoffproduction des Bac. pyocyaneus bisher giltigen Annahmen und negiert die Existenz des allgemein bekannten Pyocyanins, dessen Bildung doch so auffallend ist, dass die Vermuthung, dasselbe wäre von den besten Bakterienforschern, welche sich mit diesem Thema befasst haben, dennoch nicht gesehen worden, als unmöglich gelten muss. Ich würde die Resultate, zu denen Thumm gelangt ist, nur dann erklären können, wenn ich annehmen dürfte, dass dieser Forscher zufällig nicht die Pyocyanin erzeugende Abart dieses Bacillus in seinen Händen hatte. Dies scheint mir aber um so wahrscheinlicher, als auch ich, bei der Bestellung von Culturen des Bac. pyocyaneus α und β , aus zwei der bestrenommirten bakteriologischen Instituten, Bakterien erhielt, die in den gewöhnlichen Nährmedien keinen blauen Farbstoff, sondern nur die blaue und die grüne Fluorescenz, neben einem gelben Farbstoff, in der von Thumm genau angegebenen Reihenfolge producirten.

Beim näheren Studium des Gegenstandes überzeugte ich mich, dass auch in den Arbeiten der meisten übrigen Autoren, trotz Congruenz der Resultate in ihren Hauptzügen, Meinungsverschiedenheiten genug aufzuzeichnen sind, deren Studium und Erklärung von Interesse sein dürfte.

Im Folgenden sei es mir erlaubt, einige zu diesem Zwecke angeführte Untersuchungen mitzutheilen.

¹ C. v. Nägeli, *Untersuchungen über niedere Pilze*. München-Leipzig 1882.

² G. Ledderhose, Ueber den blauen Eiter. *Deutsche Zeitschrift f. Chirurgie*. 1888. Bd. XXVIII.

³ Kunz, Bakteriolog.-chemische Untersuchung einiger Spaltpilzarten. *Sitzungsberichte der Wiener Akademie der Wissenschaften*. 1880. Bd. XCVII.

⁴ P. Ernst, Ueber einen neuen Bacillus des blauen Eiters. *Diese Zeitschrift*. Bd. II.

⁵ Girard, *Deutsche Zeitschrift für Chirurgie*. 1876. Bd. VII.

⁶ C. Gessard, De la pyocyanine et son microbe etc. *Thèse de Paris*. 1882. Nr. 248. — *Compt. rend.* 1882. T. XCIV. Nr. 8. — *Bulletin médical*. 1899. Nr. 55.

Was zunächst die morphologischen Eigenschaften dieses von Gessard¹ entdeckten Mikroorganismus betrifft, so wissen wir, und die eigenen Untersuchungen stimmen mit den bisher bekannten vollkommen überein, dass Grösse und Gestalt dieser Spaltpilze ganz auffallend sich verändern können, je nachdem man der Nährbouillon verschiedene Substanzen zusetzt, wie dies Guignard und Charrin² gezeigt haben, dass sie sich nur durch Theilung vermehren, wie auch Jakowski³ aus dem constanten Fehlen von Sporen schliesst, dass sie Eigenbewegungen besitzen, welche ihnen wahrscheinlich von endständigen Geisseln mitgetheilt werden, und dass sie sich mit den gewöhnlichen Anilinfarbstoffen gut färben lassen.

Die biologischen Eigenschaften sind dagegen viel complicirter als die morphologischen und deren Ermittlung und Verständniss daher viel schwieriger. Man unterscheidet bekanntlich in dieser Hinsicht, seit der Ernst'schen Arbeit, zwei Varietäten oder Unterarten, den *Bac. pyocyaneus* α und den *Bac. pyocyaneus* β , und es sei von vornherein erwähnt, dass der Spaltpilz unserer Culturen mit dem Ernst'schen β -*Bacillus* vollkommen übereinstimmte.

Durch das Plattenverfahren wurde er zunächst von den übrigen im Sekrete der Wunde unseres Kranken enthaltenen Keimen befreit und isolirt in Bouillon, Gelatine, Agar und auf Kartoffeln cultivirt. Das Studium seiner Farbstoffproduction war in mehrfacher Beziehung anregend, ein voller Einblick in dieselbe liess sich aber erst durch Vergleichung dieser Culturen mit Culturen des *Bac. pyocyaneus* α gewinnen.

Die Bouilloncultur zeigte im Culturschrank, bei einer Temperatur von 32° C., schon nach 24 Stunden eine deutliche, gleichmässig vertheilte, weissliche Trübung, während am zweiten und noch mehr am dritten Tage neben der Zunahme der Trübung auch die Farbe der früher ganz blassen Bouillon deutlich gelblich wurde. Gleichzeitig erschien eine, an der Oberfläche am stärksten ausgesprochene, grünliche Fluorescenz. Vom vierten, häufiger aber erst vom fünften Tage an, trat an der Oberfläche der nunmehr stark getrübbten und von einem weisslichen Häutchen

¹ Gessard, a. a. O. — Ausserdem *Annales de l'Institut Pasteur*. 1890. p. 65.

² Guignard et Charrin, Sur les variations morphologiques des microbes. *Compt. rend. de l'Acad. des sciences*. 5 Déc. 1887.

³ M. Jakowski, Beiträge zur Lehre von den Bakterien des blauen Eiters. *Diese Zeitschrift*. Bd. XV. S. 480.

⁴ Siehe auch die *Bakteriologische Diagnostik* von Lehmann und Neumann. 1896. Bd. II. Taf. 29. — Diese Geisselfäden konnte ich jedoch, trotz wiederholter Versuche, mir nicht zur Ansicht bringen; dasselbe berichtet auch Jakowski, a. a. O. S. 48.

bedeckten Cultur eine grünliche Verfärbung auf. Diese anfänglich hellgrüne und später smaragdgrüne Farbe der oberen Schichten ging allmählich in eine dunkelblaugrüne Verfärbung der ganzen Cultur über. Dazu war jedoch stets ein Zeitraum von 2 bis 3 Wochen nothwendig.

Bei Zimmertemperatur machten die Culturen dieselben Veränderungen durch, nur benöthigte ihr Auftreten einen viel längeren Zeitraum. Auch die Menge der zur Cultur verwendeten Flüssigkeit übte einen Einfluss aus auf das langsamere oder raschere Erscheinen des Pyocyanins. In grösseren $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{2}$ Liter Culturflüssigkeit enthaltenden Kolben wurde nämlich viel später, erst nach 12 oder mehreren Tagen, die erste Spur der grünen Verfärbung beobachtet, und dies selbst dann, wenn das zur Impfung verbrauchte Material der Menge der Culturflüssigkeit so ziemlich analog war. Es scheint somit, dass weder das Pyocyanin noch dessen Leukosubstanz von vornherein gebildet werden, sondern erst dann, wenn gewisse Stoffe (Sauerstoff oder leicht Sauerstoff abgebende Substanzen) der Nährflüssigkeit durch die sich vermehrenden Bacillen verbraucht oder andere gebildet worden sind, wodurch die Bacillen, unter gewissen Bedingungen, zur Erzeugung des Farbstoffes gereizt werden.

Schüttelt man durch einige Sekunden eine an der Oberfläche leicht grünlich verfärbte Cultur, so wird mit einem Male die ganze Flüssigkeit schön moosgrün, während eine an der Oberfläche schon lebhaft grüne Bouillon prachtvoll smaragd- oder auch blaugrün wird. Hat das verwendete Nährmedium eine blässere Eigenfarbe, dann bekommen die Culturen nach dem Aufschütteln einen mehr bläulichen Farbenton.

Hier sei noch erwähnt, dass ältere schon in toto dunkelgrüne Culturen ihre Farbe durch Schütteln nicht mehr verändern. Lässt man aber solche ältere Pyocyanesculturen noch einige Zeit lang stehen, dann geht die dunkelgrüne Farbe allmählich in eine schmutzig-dunkelbraungrüne über; zuletzt verschwindet die grüne Nüance ganz, und die Bouillon wird wieder etwas heller und von rein brauner Farbe. Durch Schütteln werden solche Culturen nicht mehr verändert.

Schüttelt man eine grün werdende oder eine ältere, an sich schon grüne Cultur mit etwas Chloroform durch, so färbt sich dies letztere, wie bekannt, schön blau, blässer oder tiefer, je nach dem Alter der Cultur und der vorhandenen Pyocyaninmenge. Die Bouillon selbst wird dabei schmutzig-gelblichgrau (Gessard, Ernst u. s. w.). Zwischen dem Chloroform und der darüberliegenden Flüssigkeitsschicht sammelt sich eine dritte (Ernst a. a. O. S. 379) Schicht an, welche aus kleinen nicht zusammengeflossenen Chloroformtröpfchen besteht, deren Zusammenfliessen durch feine, aus den Bakterien der Cultur und sonstigen ungelösten Stoffen entstandene Hüllen verhindert wird.

Der in Chloroform gelöste Farbstoff ist das von Fordos¹ entdeckte Pyocyanin. Beim langsamen Verdunsten des Chloroforms bilden sich, wie allgemein bekannt ist, feine azurblaue Nadeln und Rhomben, die Pyocyaninkrystalle, welche nach längerem Stehen, rascher noch beim Einbetten in Xylolcanadabalsam, ihre blaue Farbe verlieren und bereits unter dem Auge des Beobachters, bei mikroskopischer Untersuchung, ihre Form beibehaltend, in die gelbliche Pyoxantose übergehen.

Schüttelt man das pyocyaninhaltige Chloroform mit einer kleinen Menge angesäuerten Wassers, so verschwindet die blaue Farbe des ersteren sofort, das Chloroform entfärbt sich, während die darüberliegende wässrige Schicht schön rosenroth wird. Durch einige Tropfen Ammoniak kehrt die blaue Farbe zurück, und nun kann das wiederhergestellte Pyocyanin vom Chloroform abermals aufgenommen werden. Die Pyocyaninlösungen werden nach einiger Zeit durch den Luftsauerstoff entfärbt.

Nach Ledderhose² ist das Pyocyanin eine Base und hat vermuthlich die empirische Formel $C_{14}H_{14}N_2O$. Ist dasselbe aber wirklich eine Base, die durch Alkalien frei wird, so muss ihre Verbindung mit Säuren, das Pyoerythron, ein Salz sein, dessen Lösungen rothgefärbt und viel beständiger sind als die des Pyocyanins. Das Salz selbst krystallisirt nicht und lässt sich nicht in Chloroform, leicht dagegen in Alkohol und Wasser lösen. Aus älteren, schon braun gewordenen Culturen, ist kein Pyocyanin mehr zu gewinnen.

Auch in seinen Gelatine-, Agar- und Kartoffelculturen stimmte der von mir gezüchtete Bacillus mit dem von Ernst beschriebenen und von Ledderhose angenommenen *Bac. pyocyanus* β vollkommen überein. Selbst das Chamäleonphänomen, welches Jakowski³ nicht beobachten konnte, vermochte ich genau zu verfolgen.

Die Reindarstellung des Pyocyanins beweist aber am Besten, dass wohl nur ein Irrthum vorliegen könnte, wenn Thumm die Bildung dieses Farbstoffes ganz in Abrede stellt. Aus der Vergleichung der eigenen Culturen mit denen des *Bac. pyocyanus* α ⁴ überzeugte ich mich auch, dass der genannte Autor mit Culturen dieses Bacillus gearbeitet hat, oder mit solchen, die, sei es durch ihre verschiedene Race, sei es durch längere

¹ Fordos, *Compt. rend.* T. LI. p. 215 et T. LVI. p. 1128.

² Ledderhose, a. a. O. (aus dem pikrinsauren Salze bestimmt) S. 226.

³ Jakowski, a. a. O. S. 482.

⁴ Ich liess mir vom Král'schen Institute in Prag Culturen des *Bac. pyocyanus*- α und des *Bac. pyocyanus*- β senden. Beide glichen sich jedoch ungemein, fluorescirten blau und grün und bildeten kein Pyocyanin. Ich bekam auch eine aus dem Würzburger bakteriologischen Institute stammende *Bac. pyocyanus*-Cultur, welche ebenfalls, ohne Pyocyanin zu produciren, stark fluorescirte.

Züchtung, sei es endlich durch andere Umstände, kein Pyocyanin mehr, sondern lediglich den fluorescirenden Farbstoff erzeugten. Durch die interessanten Untersuchungen Gessard's wissen wir aber, dass der *Bac. pyocyaneus* in verschiedenen Racen erscheint und nur Pyocyanin oder nur den fluorescirenden Farbstoff, oder beide, oder gar keinen Farbstoff bildet, je nachdem er auf pepton-, auf albuminhaltigem oder einem gemischten Nährboden cultivirt wird, den Thierkörper passirt¹ oder endlich auf 57 bis 58° erwärmt wird. Wiederherstellung von günstigen Ernährungsbedingungen bringt jedoch in den meisten Fällen eine Cultur zu Stande, in der beide Farbstoffe gleichmässig vorhanden sind.

Auch Mühsam und Schimmelbusch², Noesske³, Schürmeyer⁴ u. a. Autoren negiren im Einklange mit Gessard⁵ die Existenz verschiedener, präexistirender und scharf abgegrenzter Varietäten. Sie behaupten vielmehr, dass die einzelnen Bakterien jeder *Pyocyaneus*-Cultur in ihren Eigenschaften um ein Geringes von einander differiren, und wenn zufällig in den Culturen, durch die jeweiligen Züchtungsbedingungen, das ein Mal diese und das andere Mal jene, etwas verschiedene Eigenschaften besitzende Bakterien das Uebergewicht gewinnen, dann kann leicht die ganze Cultur als einer anderen Race angehörig erscheinen. Bringt man aber diese, scheinbar verschiedenen Racen in glycerinhaltigen Agar, so bildet sich nach Gessard⁶ stets wieder Pyocyanin, wodurch die Einheit der Species *Bac. pyocyaneus* klar hervortritt.

Dem gegenüber muss ich hervorheben, dass die Ergebnisse vorliegender Untersuchung mit der Ernst'schen Auffassung vollkommen übereinstimmen. Ernst unterscheidet zwei Varietäten oder Spielarten des *Bac. pyocyaneus*, den α - und den β -*Bacillus*, deren Merkmale so charakteristisch sind, dass er (a. a. O. S. 381) „niemals auch nur im Geringsten im Zweifel war, welche der beiden Racen vorlag, niemals blassten Charaktere ab zu Gunsten einer Annäherung“. Auch ich konnte niemals ein Uebergehen der einen Race in die andere, trotz zweijähriger Züchtung unter den ver-

¹ Vgl. auch Jakowski, S. 484—485.

² Mühsam u. Schimmelbusch, *Archiv f. klin. Chirurgie*. 1893. Bd. XLVI. S. 677 ff.

³ Noesske, *Beiträge zur klin. Chirurgie*. Bd. XVIII.

⁴ Schürmeyer, *Diese Zeitschrift*. 1895. Bd. XX. S. 281 ff.

⁵ Gessard, *Microbes chromogènes à pigments solubles*. *Bulletin médecine*. 1899. Nr. 55. p. 651.

⁶ Ich konnte diesen Satz nicht bestätigt finden. Glycerin-Agar rief bei denjenigen Stämmen, welche auch sonst kein Pyocyanin producirten, d. i. bei der α -Race des *Bac. pyocyaneus*, keine Farbstoffbildung hervor, eher verblasste um ein Geringes der sonst reichlich farbstoffbildende Stamm (der *Bac. pyocyaneus* β).

schiedensten Ernährungsbedingungen, beobachten. Stets konnte ich ganz sicher (bei Anwendung der gewöhnlichen Nährböden, Bouillon, Agar, Gelatine, Kartoffel) die eine von der anderen unterscheiden.

Die Unterscheidungsmerkmale, welche dies ermöglichten, beschränkten sich jedoch nicht nur auf das schnellere oder langsamere Wachstum, auf die schnellere oder langsamere Verflüssigung der Gelatine und die verschiedene Farbstoffproduction, sondern auch auf die morphologischen Charaktere der Culturen, welche bisher als gar nicht oder nur wenig verschieden beschrieben werden.

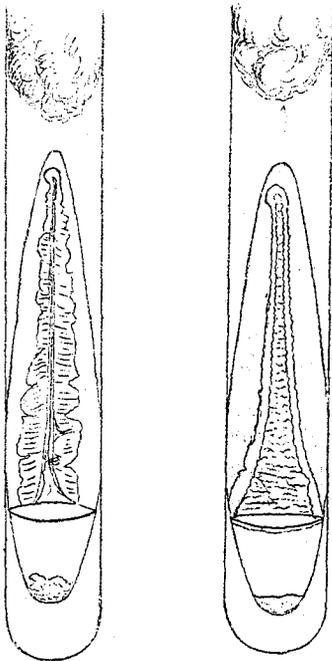


Fig. 1.

Fig. 2.

Fertigt man auf Agar Strich-culturen des *Bac. pyocyaneus* α , so bemerkt man, dass der Strich sehr bald sich zu einer nach oben zu spitzen, vogelfederartigen Figur umbildet, deren axialer Theil prominirt, während beide Seiten abgeflacht, fein gerippt und am Rande ausgebeuchtet erscheinen (vgl. Fig. 1). Die Colonie selbst ist weisslichgrau, das Nährmedium gelb, grünlich fluorescirend.

Beim *Bac. pyocyaneus* β ist die Strichkultur anfangs der vorerwähnten sehr ähnlich, sie verändert sich aber bald in der Weise, dass die axialen, wellig gezeichneten Partien flacher und durchscheinender erscheinen, während die Peripherie der Colonie compacter wird und in Form eines peripheren, weisslichgrauen Bandes die ganze Colonie umgiebt (vgl. Fig. 2). Diese letztere selbst

ist grauweiss, während der Culturboden intensiv blaugrün gefärbt ist.

Bei künstlicher (Gas)-Beleuchtung verliert bekanntlich die erstere Cultur ihre grünliche Fluorescenz und erscheint blassgelblich, während die β -Cultur ihre grüne Farbe unvermindert beibehält.

Dass dennoch die Bacillen beider Culturen auf's Engste mit einander verwandt sind und eigentlich einer einzigen Art angehören, geht aus folgendem Experimente hervor, welches ich aus Anlass der auf S. 69¹

¹ A. a. O.

ausgesprochenen Behauptung Thum m's¹ ausführte. Ich benützte zunächst die unveränderte von Gessard² empfohlene Nährflüssigkeit und bereitete ausserdem noch drei Lösungen, in denen ich der Reihe nach je eines der drei anorganischen Salze, aus denen sie neben bernsteinsaurem Ammon besteht, wegliess. Die damit versehenen Röhrechen wurden mit den Nummern I, II, III und IV bezeichnet und am 8. November 1899 mit dem verschiedenen mir zu Gebote stehenden Materiale geimpft.

	I	II	III	IV
Ammonii succinici	2·00	2·00	2·00	2·00
Calcii chlorati	0·25	—	0·25	0·25
Kalii phosphor.	1·00	1·0	—	1·00
Magnesii sulfur.	0·50	0·50	0·50	—
Aquae	200·00	200·00	200·00	200·00

1. *Bacillus pyocyaneus* α (*Bac. pyofluorescens*) Gessard. In den mit den Nrn. I, II und IV bezeichneten Röhren trat 24 Stunden nach der Impfung bei gewöhnlicher Temperatur eine leichte Trübung auf, welche nach 48 Stunden deutlicher wurde. Nach 72 Stunden ward die Flüssigkeit in Nr. I und IV milchig getrübt und zeigte bereits eine bläuliche Fluorescenz. Bei Nr. II erschien die Trübung etwas weniger ausgesprochen, während in den mit Nr. III bezeichneten Röhren die Flüssigkeit fast vollkommen klar blieb. Am sechsten Tag zeigte Nr. I starke Trübung, gelbliche Verfärbung des Inhaltes und eine grünliche Fluorescenz, Nr. II war schwächer getrübt, Nr. III war noch ganz klar, während Nr. IV sehr starke Trübung bei geringer Fluorescenz aufwies. Sechs Monate nach der Impfung (im April 1900) zeigten Nr. I und IV starke Trübung, gelbliche Verfärbung des deutlich und charakteristisch aromatisch riechenden Inhaltes und grünliche Fluorescenz. An der Oberfläche der etwas dicklich gewordenen Culturflüssigkeit haben sich kleinere und grössere, rhombische, farblose Krystalle ausgeschieden, von denen einzelne sich zu Boden gesenkt haben. Die schimmernden Flächen dieser

¹ Thumm behauptet, dass die meisten Forscher nur deswegen mehrere (2-3) Pigmente aus ihren Culturen isoliren konnten, weil sie mit complicirten organischen Verbindungen (Bouillon, Agar, Gelatine) arbeiteten, in denen aus der Zersetzung des Eiweissmoleküls gefärbte Körper in geringer Menge leicht gebildet werden können. In den von ihm angewendeten einfachen Nährlösungen können aber solche Pigmente nicht entstehen, und die bei Abwesenheit der phosphorsauren Salze auftretende blaue Farbe erklärt Thumm einfach als Lichtbrechungserscheinung, da doch jede leicht getrübt Flüssigkeit einen blauen Schimmer zeigt (a. a. O. S. 79).

² Vgl. die Arbeit Thumm's S. 12.

Krystalle erscheinen fein gerippt. Durch Schütteln wird das Aussehen der Cultur nicht wesentlich verändert. An Chloroform wird kein Pyocyanin abgegeben.

Bei den mit Nr. II versehenen Röhren sind ungefähr dieselben Veränderungen eingetreten¹, während bei den phosphorfreien, mit Nr. III markirten, die Flüssigkeit zwar klar blieb, jedoch eine schön blaue Farbe annahm. Bodensatz spärlich, durch Schütteln wird derselbe aufgewirbelt und der Inhalt dadurch etwas getrübt, die blaue Farbe wird aber dadurch nicht verändert. Keine Krystallbildung², keine Fluorescenz, keine Geruchsentwicklung. An Chloroform wird reichlich Pyocyanin abgegeben.

Im Juli 1900 „status idem“.

2. Auch die selbst gezüchteten Culturen des *Bac. pyocyaneus* β , welche in den gewöhnlichen Nährmedien so sehr von denen des *Bac. pyocyaneus* α abweichen, glichen jetzt den oben beschriebenen fast gänzlich. Auch hier trübten sich die mit I, II und IV bezeichneten Röhren ziemlich stark und schon nach 72 Stunden war eine deutliche, grünliche Fluorescenz wahrzunehmen. Gleich wie bei *Bac. pyocyaneus* α , blieben auch hier die sub Nr. III Röhren lange Zeit hindurch vollkommen klar und farblos, so dass man meinen könnte, sie wären steril geblieben, bis nach mehreren Wochen, bei ganz leichter Trübung, die blaue Farbe erschien und eine viel grössere Intensität, als beim erstgenannten Bacillus erreichte. Es fehlte dabei die Fluorescenz sowohl, als auch der aromatische Geruch.

Wir sehen also, dass in den mit Nr. I, II und IV bezeichneten Röhren, gleichgiltig mit welcher der beiden Pyocyaneusracen dieselben abgeimpft werden, kein Pyocyanin erzeugt wird, während umgekehrt in den sub Nr. III Culturen, in denen die Phosphorsäure fehlt, bei ganz geringfügiger Vegetation reichlich Pyocyanin gebildet wird. Daraus aber,

¹ Es fiel auf, dass trotzdem alle Culturröhrchen, in einem Zeitraum von neun Monaten, gleichmässig der Verdampfung preisgegeben waren, die Flüssigkeit in denjenigen Röhren sich am stärksten verminderte, in denen das üppigste Bacillenwachstum zu beobachten war, d. i. also in den mit I, II und IV bezeichneten. Es scheint also, dass diese Culturen durch reichliche Gasebildung stärker an Volumen verloren haben, und wir wissen ja, seit Jakowski's Arbeit (a. a. O. S. 485—487), dass der *Bac. pyocyaneus* ausser anderen Substanzen auch Schwefelwasserstoff und Methylmercaptan producirt.

² Auch die Krystallbildung in den Culturen schien wesentlich von der Vermehrung der Bakterien abzuhängen. Krystalle zeigten sich nämlich nur in den Röhren, in denen lebhaftes Keimen zu beobachten war (in Nr. I, II u. IV), während in den mit III bezeichneten und den steril belassenen Culturröhren, keine Krystalle gebildet wurden.

dass einerseits die Culturen des *Bac. pyocyaneus* α , welche weder in Bouillon noch in Gelatine oder in Agar Pyocyanin produciren, plötzlich, beim Fehlen des Phosphors, dasselbe bilden, und dass anderseits die Culturen des *Bac. pyocyanin* β , die in allen den gewöhnlich benützten Nährmitteln Pyocyanin bereiten, in den mit Nr. I, II und IV bezeichneten Culturen dasselbe nicht mehr erzeugen, geht die enge Verwandtschaft der beiden Racen auf's Deutlichste hervor.

In einer zweiten Versuchsreihe, in der ich die Menge des der Nährlösung zugesetzten phosphorsauren Kaliums auf das $\frac{1}{8}$ verringerte, erschien die blaue Farbe, wenn auch mit geringerer Intensität, auch bei den mit I, II und IV bezeichneten Culturen des *Bac. pyocyaneus* β , jedoch nicht bei denen des *Bac. pyocyaneus* α (vgl. auch Gessard, Thumm, S. 49 u. A.).

Wenn nun Thumm (auf S. 78) behauptet, dass beim Fehlen des Phosphats ein kaum merkliches Wachstum und in Folge dessen auch keine Fluorescenz stattfindet, so ist dies nach dem eben Erwähnten nicht richtig. Wachstum und Farbstoffbildung sind nämlich Eigenschaften, welche nicht immer in geradem Verhältnisse zu einander stehen, und oft hemmen die äusseren Bedingungen die Entwicklung der einen Eigenschaft, während sie die der anderen begünstigen.

Noch auf einen Punkt der letztgenannten interessanten und fleissigen Arbeit möchte ich hier aufmerksam machen. Es wird (auf S. 72) behauptet, dass beim Schütteln einer *Pyocyaneus*-Cultur keine Leukosubstanz zu Pyocyanin oxydirt wird, sondern dass dabei das in der Oberfläche gebildete und in der Ruhe auch dort verbleibende Ammoniak in die Tiefe dringt und die grüne Fluorescenz verursacht. Zum Beweise führt dieser Forscher folgendes Experiment aus. In einem Scheidetrichter wird der *Bac. pyocyaneus* in Gelatine gezüchtet bis vollständige Verflüssigung eingetreten ist, dann lässt er die untere Hälfte in eine Culturröhre auslaufen und schüttelt beide Theile separat und heftig durch. Die obere Partie fluorescirt alsdann stark moosgrün, während die untere gar nicht fluorescirt. Daraus folgert Thumm, dass die Annahme Ledderhose's von der Bildung des Pyocyanins durch Oxydation eines Leukofarbstoffes nicht richtig sein kann. Ich wiederholte diesen Versuch mit Culturen des *Bac. pyocyaneus* α und den eigenen und fand, dass Thumm in Bezug auf den *Bac. pyocyaneus* α , der übrigens auf den gewöhnlichen Nährböden kein Pyocyanin producirt, Recht hat, und dass in der That die Einwirkung des Alkalis auf den gelben Farbstoff die Fluorescenz bewirkt. Was aber den echten *Bac. pyocyaneus* β der eigenen Culturen anbetrifft, so ist diese Ansicht als absolut unrichtig zu nennen, denn beim Schütteln wurden beide Hälften schön und tief blaugrün.

Zum Beweise, dass das Pyocyanin nicht als solches vorgebildet, sondern wirklich das Produkt der Oxydation einer Leukosubstanz (im Sinne Nägeli's, Ledderhose's u. a. Autoren) ist, führte ich folgenden Versuch aus: Lässt man eine durch Schütteln grün gewordene Cultur des *Bac. pyocyanus* β durch einige Zeit ruhig stehen, so wird sie allmählich, von unten beginnend nach oben entfärbt, und nur die Oberfläche behält ihre grünliche Farbe. Das Pyocyanin wird von den sauerstoffgierigen Bakterien desoxydirt und in die farblose Verbindung zurückgeführt. Kochte ich aber oder sterilisirte eine bereits grügefärbte Cultur bis zur Abtödtung aller Bakterien, so behielt dieselbe die einmal angenommene grüne Farbe unverändert lange fort. Erst als ich dieses Culturröhrchen durch einen starken und dichten Gummischlauch mit einer zweiten sauerstoffabsorbirenden Röhre, in die ich Pyrogallussäure in alkalischer Lösung that, in Verbindung setzte, verschwand die grüne Farbe. Entfernte ich den verbindenden Schlauch und schüttelte das Röhrchen, auch ohne dessen Watterverschluss abzunehmen, ein paar Mal durch, so wurde das Pyocyanin rasch wieder hergestellt.

Auch ein eben geimpftes Bouillonröhrchen setzte ich in Verbindung mit dem sauerstoffabsorbirenden Apparat. Der Bacillus vermehrte sich auch jetzt mit grösster Lebhaftigkeit, und die Flüssigkeit trübte sich, aber ausser der gelben Verfärbung war kein blauer Farbstoff und keine Fluorescenz zu beobachten. Nach sechs Tagen wurde der Schlauch entfernt und die Cultur einige Mal hin und her geschwenkt, worauf fast augenblicklich die grüne Farbe zum Vorschein kam. Dasselbe fand statt, als ich eine gelbliche unter Sauerstoffmangel gewachsene Cultur durch Kochen zuerst sterilisirte und dann erst der Luftwirkung aussetzte. Auch diese Cultur wurde augenblicklich grün und blieb fortan so gefärbt.

Aus dem Gesagten geht mithin hervor:

1. Dass trotz gegentheiliger Behauptungen zwei Racen des *Bac. pyocyanus* existiren, welche nicht nur in biologischer Hinsicht, sondern auch in morphologischer Beziehung (in ihren Agar-Strichculturen) von einander abweichen, deren nahe Verwandtschaft jedoch auch dadurch bewiesen wird, dass, bei der Eliminirung der Phosphorsäure aus den Culturflüssigkeiten, alle *Pyocyanus*racen plötzlich Pyocyanin produciren.

2. Dass der *Bac. pyocyanus* α keinen blauen Farbstoff, wohl aber eine blaue, rasch grün werdende Fluorescenz auf den gewöhnlich benützten Nährmedien bereitet.

3. Dass der *Bac. pyocyanus* β thatsächlich Pyocyanin bildet, und dass dasselbe, trotz der Behauptung Thumm's, nicht nur aus den complicirten Nährböden, sondern auch aus den künstlichen einfachen Nährlösungen isolirt werden kann.

4. Dass das Pyocyanin aus einer Leukosubstanz durch Sauerstoffzufuhr entsteht, und dass dazu gar nicht einmal die Anwesenheit von den lebenden Bacillen nothwendig ist, da die Veränderung auch in einer sterilisirten Cultur vor sich gehen kann.

5. Dass der *Bac. pyocyaneus* auch unter Sauerstoffabschluss nicht nur gut leben und wachsen, sondern auch die erwähnte Leukosubstanz produciren kann.

6. Dass durch hohe Temperaturen (Sterilisation) weder das Pyocyanin selbst, noch dessen Leukosubstanz zersetzt werden kann, und endlich

7. dass das Pyocyanin, indem es von den Bakterien reducirt wird, eine Sauerstoffquelle für dieselben genannt werden kann.¹ Werden die Mikroorganismen abgetödtet, so findet spontan keine Reduction mehr statt. Eine solche kann dann nur mehr durch sauerstoffabsorbirende Mittel bewirkt werden.

¹ Auf S. 261 wurde erwähnt, dass die grüne Farbe der Culturen mit zunehmendem Alter stärker wird, und endlich, auch in der Ruhe, das ganze Röhrchen, bis tief herunter, einnimmt. Dies ist so zu erklären, dass das Pyocyanin nur so lange verändert wird, als noch eine Vermehrung der dasselbe reducirenden Bacillen stattfindet. Dann wird kein oder nur mehr wenig Sauerstoff verbraucht und das Pyocyanin bleibt unverändert liegen und färbt die ganze Cultur. Erst später, nachdem auch die Bildung des Pyocyanins aufgehört hat und das schon gebildete allmählich zersetzt wurde, nimmt die Cultur eine braune Farbe an.