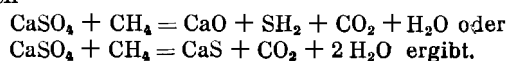


Methan in Berührung mit schwefelsaurem Kalk, so daß sich



Die freiwerdende Kohlensäure entweicht entweder ungebunden oder, wie in diesem Falle deutlich zu beobachten ist, sie tritt in Verbindung. Kohlensäure wandelt Calciumsulfid in Calciumcarbonat und Schwefelwasserstoff um. Schwefelwasserstoff in Berührung mit Luft scheidet Schwefel aus. Es ist also die Entstehung des gediegenen Schwefels durch Reduktion zu vergleichen mit dem Vorkommen gediegenen Silbers auf asphaltführenden Gangspalten in Skandinavien oder mit dem Vorkommen von Schwefelkies, Bleiglanz, Kupferkies und Zinkblende in der Steinkohle.

In der Nähe des Schwefeldomes von Gulf liegt ein anderer interessanter Dom des Golfküstengebietes, nämlich der von Markham, der ebenfalls im Bilde vorgeführt worden ist.

Dieser Dom ist theoretisch dadurch bekannt geworden, daß hier zum ersten Male Kali, allerdings nicht in abbauwürdiger Form, aufgefunden ist. Ebenso enthält das Erdgas des Domes von Markham verhältnismäßig viel Helium, das für Luftschiffzwecke hier gewonnen worden ist. Gegenwärtig ist von Markham eine Gasleitung nach dem Schwefelwerk von Gulf geleitet worden, das seine Ölfeuerung abwirft und zu einer bequemen Gasfeuerung übergeht. Ebenso wird der Dom von Markham jetzt an die große Gasleitung angeschlossen, die aus dem Kleeberg-County und der Gegend von Corpus Christi nach Houston geführt wird.

In der gleichen Gegend, 38 Meilen südwestlich von Houston, liegt im Brazoria-County der interessante Dom Damon Mount. Hier hatten früher die Karanava-Indianer ihren Wohnsitz und sie verhandelten den „Sour-Dirt“ als Heilerde an die benachbarten Stämme. Der Dom heißt nach Samuel Damon, einem Schwarzschnied, der sich 1831 dort ansiedelte, nachdem er in der steinarmen Gegend des Osthangs einen Kalksteinausbiß gefunden hatte, der sich zum Häuserbau benutzen ließ. Der Caprock des Domes kam hier zutage. In den Schluchten kamen reine Schwefelkristalle vor. Inzwischen haben eine ganze Reihe von Bohrungen auch dieses Schwefelvorkommen bestätigt. Trotz zahlreicher Versuche kam es aber nicht zur Anlage eines Schwefelwerkes, weil Vorrat und Qualität doch nicht genügend befriedigte.

Damit möchte ich meine Ausführungen schließen. Ich nehme an, es wird mehr interessiert haben, über die Anwendung der geophysikalischen Methoden aus einem besonders bedeutsamen Arbeitsgebiet zu hören, als eine Aufzählung aller Arbeitspunkte, aller Erfolge, aller Fehlschläge und Irrtümer sich vorführen zu lassen. Ich möchte nicht schließen, ohne darauf aufmerksam zu machen, daß die Entwicklung der geophysikalischen Untersuchungsmethoden in den nächsten Jahren noch eine außerordentlich starke sein wird, und daß unsere theoretischen Kenntnisse vom Bau der Erdrinde durch die praktische Betätigung derselben hoffentlich eine erfreuliche Bereicherung erfahren werden. [A. 146.]

## Einiges über Tetanustoxin und seine Zerstörung.

Von Dr. G. WESENBERG, Elberfeld.

Vorgetragen in der Fachgruppe für medizinisch-pharmazeutische Chemie auf der Hauptversammlung in Kiel.

(Eingeg. 29. Mai 1926.)

Bei stark zerrissenen, mit Kleiderfetzen, Erde, Holzsplittern usw. verunreinigten Wunden besteht immer die Gefahr des Auftretens von Wundstarrkrampf (Tetanus).

Die örtliche Wundbehandlung wird daher gern solche Mittel zur Anwendung bringen, welche neben allgemeiner Desinfektion besonders den Erreger des Wundstarrkrampfes, den Tetanusbazillus, abtöten oder doch wenigstens das von ihm gebildete Gift, das Tetanustoxin, zerstören. Die Benutzung solcher chemischen Stoffe scheint dann besonders angebracht, wenn die Serumbehandlung, die ja namentlich bei prophylaktischer Anwendung den sichersten Schutz gegen Ausbruch des Tetanus bietet, nicht rechtzeitig erfolgen kann, wie z. B. auf dem Lande. In der Veterinärmedizin werden solche Mittel besonders gern benutzt.

Ehe ich zu meinen eigentlichen Ausführungen komme, möchte ich erst ganz kurz auf die Bakteriologie des Wundstarrkrampfes eingehen. Der Tetanusbazillus ist ein schlankes, schwach bewegliches grampositives Stäbchen, das sehr widerstandsfähige, endständige Sporen bildet, so daß ein solches Stäbchen die sogenannte Trommelschlägerform besitzt. Es wächst nur unter Abschluß von Sauerstoff — also anaerob; bei Gegenwart von sehr sauerstoffbedürftigen anderen Bakterien, z. B. Fäulnisorganen, die ihm den Sauerstoff wegnehmen, kommt er auch zur Vermehrung, also auch in bakteriell noch anderweitig verunreinigten, ziemlich oberflächlichen Wunden.

Gefährlich wird der Tetanusbazillus in der Wunde nicht durch seine Vermehrung, die häufig nur eine verhältnismäßig geringe ist, sondern nur durch die Ausscheidung eines Giftes, des Tetanustoxins. Dieses Toxin wird dann aus der Wunde durch die motorischen Nervenbahnen zum Zentralnervensystem geleitet und dort verankert; mit der fortschreitenden Anreicherung treten dann die verschiedenen Erscheinungen des Wundstarrkrampfes auf. Neben dem die hervorstechende krampfzeugende Wirkung besitzenden Tetanospasmin ist im Tetanustoxin noch ein Tetanolysin genannter Anteil vorhanden, der auf die roten Blutkörperchen auflösend wirkt. Dieses Tetanolysin soll hier aber unberücksichtigt bleiben.

Auch in den künstlichen Kulturen, die mit eigenartigem Geruch unter reichlicher Gasentwicklung (Wasserstoff und Methan) wachsen, kommt es zur Bildung des Giftes, das ein Exotoxin ist, also von dem Bakterium in seine Umgebung — die Wunde oder den Nährboden — ausgeschieden wird.

Zur künstlichen Gewinnung des Tetanustoxins benutzt man am besten Reinkulturen in flüssigen Nährlösungen, die unter anaeroben Verhältnissen gehalten werden. Nach 6–8 Tage langer Bebrütung bei 37° ist meist eine starke Toxinbildung eingetreten; die Flüssigkeit wird dann durch bakteriendichte Filter von den Bakterienleibern getrennt. Von einem solchen Filtrat genügt unter Umständen bereits die Einspritzung von  $\frac{1}{100\,000}$  ccm ( $\frac{1}{100}$  mg), um bei einer Maus die typischen Erscheinungen des Wundstarrkrampfes — also allein durch Giftwirkung — auszulösen und das Tier zu töten.

Das Gift verliert in der dünnen Lösung, in welcher Form es im Kulturfiltrat vorliegt, ziemlich rasch seine Wirksamkeit; es kann aber, am besten durch Fällen mit Ammoniumsulfat nach Brieger und Fränkel, zur Abscheidung gebracht und dann trocken aufbewahrt werden. Die chemische Natur des Giftes ist noch nicht geklärt, es scheint noch nicht einmal ganz einwandfrei festzustehen, ob es zu den Eiweißkörpern gehört oder nicht. Bei meinen im Herbst 1914 begonnenen Versuchen ging ich vom Filtrat einer 4 Tage alten Bouillonkultur aus; von ihm tötete bei der Einspritzung unter die Haut 0,1 ccm eine Maus (von etwa 20 g) innerhalb 24 Stunden; bei

0,01 ccm traten nach 24 Stunden die ersten tetanischen Krämpfe auf, die nach 48 Stunden äußerst heftig waren und über Nacht zu Tode führten. Bei Injektion von 0,001 ccm stellte sich nach 48 Stunden Krümmung des Rückens und eine beginnende Steifheit des rechten Hinterbeines (Injektionsstelle) ein, das nach 4 Tagen völlig steif war; unter typischen tetanischen Krämpfen ging das Tier am 9. Tage ein. Zwei Mäuse, mit je 0,0001 ccm des Kulturfiltrats geimpft, blieben völlig gesund. Durch Fällung mit Ammoniumsulfat nach Brieger und Fränkel erhielt ich aus der Bouillon 1,05 % Rohtoxin, das noch reichliche Mengen von Ammoniumsulfat enthält, von dessen weiterer Reinigung ich aber absah. Mit diesem Rohtoxin gelang es wiederholt, Mäuse mit einem Durchschnittsgewicht von 16–20 g durch 0,01 mg zu töten, mindestens aber schwer krank zu machen; regelmäßig gingen die Mäuse aber nach Dosen von 0,05 mg ein. Bei der Fällung mit Ammoniumsulfat wird also das Toxin zum größten Teil, wenn nicht gar quantitativ, erhalten. Was die Haltbarkeit des Trockentoxins anbelangt, so ist diese eine recht gute, genügen doch jetzt, nach über 11 Jahre langer Aufbewahrung, noch 0,075 mg davon, um Mäuse nach 4–5 Tagen sicher zu töten — fast genau wie bei der Herstellung. Die Aufbewahrung erfolgte in einem mit Korkstopfen verschlossenen Präparatenzylinder meist bei einer Temperatur von 1–5° in einem selbsttätig sich einstellenden Kühlschrank.

Erwähnenswert scheint noch, daß der Versuch, das Tetanusbouillonfiltrat durch Zusatz von wasserfreiem Natriumsulfat zur Trockne zu bringen, insofern mißlang, als dabei das Toxin völlig zerstört wurde.

Zu allen meinen Versuchen (es sind fast 250), über die ich nun kurz zusammenfassend berichten möchte, benutzte ich das erwähnte Rohtoxin. Zu den Versuchen wurde ich angeregt durch das bei Beginn des Krieges rasch erfolgende massenhafte Auftreten von Wundstarrkrampf, zu dessen Behandlung das notwendige Tetanusheils Serum zeitweise fehlte. Bei der genauen Durchsicht der Literatur ergab sich nun, daß die Angaben in Zusammenfassungen, Lehrbüchern usw. über die Zerstörung des Tetanustoxins zum großen Teil nur ungenügend durch quantitative Versuche belegt sind, wenigstens soweit es sich um die Wirkung von Oxydationsmitteln handelt. Zunächst wandte ich mich dem Wasserstoffperoxyd zu, zumal sich dieses im Felde bald besonderer Beliebtheit erfreute; wird doch durch die Katalase des Wundsekretes eine rasche Zersetzung des Wasserstoffsuperoxydes unter starkem Aufschäumen herbeigeführt und so die mechanische Entfernung von Eiter, aber auch von Erdteilchen, Kleiderfetzen usw. begünstigt. In der Form der kristallinischen Harnstoffverbindung  $(\text{CO}[\text{NH}_2]_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2)$  läßt es sich gut verpacken, dosieren und, was für tiefe Wundkanäle oft erwünscht ist, auch in geeignete Stäbchenformen pressen. Als ein solches Produkt verwandte ich zu meinen Untersuchungen das Ortizon mit etwa 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  — im folgenden will ich aber aus naheliegenden Gründen einfach von „Peroxyd“ sprechen.

Von den zahlreichen Versuchen soll nur eine einzige Reihe in einer Tabelle gebracht werden, weil diese die wesentlichsten Ergebnisse erkennen läßt. 0,25 mg Tetanustoxin (gleich etwa der fünffachen für Mäuse tödlichen Dosis) wurden mit 2 mg, 4 mg, 10 mg und 20 mg Peroxyd zusammengebracht, und zwar in solchen Lösungsverhältnissen, daß 1-, 2-, 5- und 10%ige Lösungen von Peroxyd auf das Toxin einwirkten; ebenso 0,5 mg (10fache tödliche Dosis), 1,0 mg (20fache), 2,5 mg (50fache) und

5 mg (100fache tödliche Dosis). Nach Einwirkungszeiten von 1, 2½ und 5 Minuten wurde damit je eine Maus subkutan gespritzt. Wir sehen aus der Tabelle folgendes:

Tet.-Tox.	Letale Dosis	Einwirkungszeit	Ortizon			
			2 mg	4 mg	10 mg	20 mg
5 mg	100fach	1 Min.	X	X	X	X
		2½ „	X	X	X	X
		5 „	X	X	X	X
2,5 mg	50 „	1 „	X	X	X	X
		2½ „	X	X	X	X
		5 „	X	X	X	?
1,0 mg	20 „	1 „	X	?	X	X
		2½ „	X	X	X	?
		5 „	X	X	X	X
0,5 mg	10 „	1 „	X	?	X	00
		2½ „	X	?	0	X
		5 „	X	X	00	00
0,25 mg	5 „	1 „	X	X	X	X
		2½ „	X	X	00	00
		5 „	X	0	00	00

X Tod etwa wie Kontrolle.

0 Krank, aber überlebend.

X Tod etwas verzögert.

00 Ohne Anzeichen.

X Tod sehr verzögert.

? Vorzeitig tot.

Mit steigender Einwirkungszeit nimmt die zerstörende Wirkung des Peroxyds zu.

Die zerstörende Wirkung macht sich erst deutlich bemerkbar, wenn auf 1 Teil Toxin mindestens 8 Teile des Peroxyds kommen, indem dann wenigstens so viel des Toxins zerstört wird, daß der Tod um mehrere Tage verspätet eintritt. Erst bei etwa 10–15facher Menge tritt nach 5 Minuten, bei 40facher Menge nach 1 bzw. 2½ Minuten völlige Aufhebung der Giftigkeit des Toxins ein.

Mit zunehmender Toxinmenge scheint die für die Entgiftung notwendige Menge von Peroxyd nicht proportional zu steigen, sondern eine größere Menge erforderlich zu werden.

Der in einigen Fällen vorzeitig erfolgte Tod ist fast ausnahmslos eine Folge von Luftembolie gewesen, bedingt durch rasche Zersetzung des Peroxyds im Gewebe.

Eine weitere Versuchsreihe, in der auf 0,5 mg Tetanustoxin gleichmäßig 6 mg, 4 mg und 2 mg Peroxyd 2½ Minuten lang einwirkten, aber in 2 % igen, 1 % igen und 0,5 % igen Lösungen, zeigt ziemlich eindeutig, daß auch die Konzentration der Peroxydlösung einen Einfluß auf die Zerstörung ausübt, indem mit steigender Konzentration bei gleichbleibender Peroxydmenge die Wirkung zunimmt, das heißt also: der Tod später eintritt.

Nach dem Kriege dehnte ich dann die Versuche noch auf die chlorabgebenden Oxydationsmittel aus, und zwar einerseits auf das Calciumhypochlorit, andererseits auf das p-Toluolsulfonchloramid-Natrium.

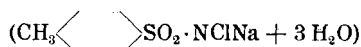
Als Calciumhypochlorit benutzte ich nicht den gewöhnlichen Chlorkalk, sondern das haltbare Caporit mit einem Gehalt an aktivem Chlor von rund 60 %. Als Versuchstiere dienten weiße Ratten, deren Empfindlichkeit für das Tetanustoxin, auf das Körpergewicht bezogen, die gleiche ist, wie die der Mäuse. Entsprechend dem längeren Wege, den das Tetanustoxin bis zum Zentralnervensystem zurückzulegen hat, stellen sich die ersten Anzeichen der Erkrankung und auch der Tod bedeutend später ein als bei der Maus. Durch Einspritzung von 0,375 mg unseres Rohtoxins auf je 100 g Ratte gingen die Tiere nach 10–13 Tagen ein.

Wirkten nun auf 1,5 mg Tetanustoxin, die etwa 4fache letale Dosis, 0,15 mg des Hypochlorits, 5 Minuten lang ein

100 Teile Tetanustoxin werden innerhalb 5 Minuten zerstört durch etwa				Zur Zerstörung sind erforder- lich an O <sub>2</sub> (Chloramid = 1)	1 Teil Substanz zerstört an Tetanus- toxinteilen
1000 Teile	Hydroperoxyd (30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> = 14,1% O)	= rund 140 Teile O <sub>2</sub>		300	1/10
1000 "	Ammoniumpersulfat (= 7,0% O)	= " 70 " O <sub>2</sub>		150	1/10
3,2 "	Kaliumpermanganat	= " 0,8 " O <sub>2</sub>		2	30
5 "	Calciumhypochlorit (58,6% Cl = $\frac{58,6 \cdot 5 \cdot 16}{100 \cdot (2 \cdot 35,5)}$ O <sub>2</sub> )	= " 0,66 " O <sub>2</sub>		1,5	20
7,5 "	Chloramid (25,9% Cl = $\frac{25,9 \cdot 7,5 \cdot 16}{(2 \cdot 35,5)}$ O <sub>2</sub> )	= " 0,44 " O <sub>2</sub>		1	13

(wobei das Hypochlorit sich in einer Verdünnung 1 : 3300 befand), so blieben — ebenso wie bei größeren Mengen — die Tiere am Leben; die nächst kleinere Dosis von 0,05 mg Hypochlorit (1 : 10 000) konnte das Tetanustoxin nicht mehr zerstören. Es vermag also 1 Teil des Hypochlorits die etwa 20fache (10—30fache) Gewichtsmenge von unserem Rohtoxin unschädlich zu machen.

Im Calciumhypochlorit ist das Chlor verhältnismäßig locker gebunden; es kann z. B. durch Kohlendioxyd freie unterchlorige Säure ausgetrieben werden; mit dem als Verunreinigung im vorliegenden Tetanustoxin noch vorhandenen, etwa 13 % betragenden, Ammoniumsulfat reagiert es bei der deutlich sauren Reaktion des Toxins unter Gasentwicklung; und zwar wird unter den Versuchsverhältnissen rund ein Viertel des Hypochlorits durch das Ammoniumsulfat zersetzt, geht also für die Wirkung auf das Toxin verloren. Im p-Toluolsulfonchloramidnatrium dagegen ist das Chlor ziemlich fest gebunden,



so daß es z. B. mit Ammoniumsulfat nicht mehr reagiert. Von den verschiedenen Handelsprodukten benutzte ich das Tolidnatrium mit 25,9 % aktivem Chlor. Die Prüfung an Mäusen ergab, daß zur Entgiftung von

2 mg Toxin 0,4 mg des Chloramids in einer Konzentration  
1 : 5000

1 mg Toxin 0,1 mg des Chloramids in einer Konzentration  
1 : 10 000

erforderlich waren, das Chloramid also die 5—10fache Menge des Toxins innerhalb 5 Minuten unschädlich machen kann.

In letzter Zeit<sup>1)</sup> prüfte ich noch das Kaliumpermanganat bezüglich seiner entgiftenden Wirkung auf das Tetanustoxin und fand als unterste Grenze noch wirksam 0,2 ccm einer 1/1000-Normal-KMnO<sub>4</sub>-Lösung in 1 ccm einer Mischung mit 0,2 mg Toxin; es berechnet sich daraus, daß zur Zerstörung von 100 Teilen Toxin 3,16 Teile KMnO<sub>4</sub> — 0,80 Teile Sauerstoff erforderlich sind bei 5 Minuten langer Einwirkung.

Daß das Toxin leichter oxydiert wird als die es begleitenden organischen Substanzen in unserem Rohtoxin, geht wohl daraus hervor, daß innerhalb 5 Minuten durch 0,2 mg Toxin 1—1,5 ccm der 1/1000 KMnO<sub>4</sub>-Lösung entfärbt werden, während nur 0,2 ccm davon zur Entgiftung notwendig sind.

Schließlich kam von wohldefinierten chemischen Substanzen noch das Ammoniumpersulfat zur Prü-

fung. 0,2 mg Toxin werden in 1 ccm Lösung durch 2,5 mg Substanz unschädlich gemacht, durch 1 mg stark geschädigt, durch 0,5 mg aber nicht beeinflußt. Zur Unschädlichmachung ist also die etwa 10fache Menge Ammoniumpersulfat erforderlich.

In der Literatur finden wir noch die Angabe, daß die Oxydasen das Tetanustoxin zerstören sollen. Eine mir zur Verfügung stehende Peroxydase aus Meerrettich vermochte selbst in Mengen von 2,5 bis 25 mg nicht die Wirkung von 0,2 mg Tetanustoxin in 5 Minuten aufzuheben; ebenso unwirksam erwies sich eine Oxydase aus Kartoffeln hergestellt.

Schließlich reizte es mich noch, festzustellen, ob das durch Peroxydase gewissermaßen aktivierte Wasserstoffperoxyd auf das Tetanustoxin stärker einwirkte als das Peroxyd allein. Zu der Lösung von je 0,2 mg Toxin mit 10 mg Peroxydase<sup>2)</sup> setzte ich also steigende Mengen Peroxyd in Form von Ortizon und spritzte, wie immer nach 5 Minuten langer Einwirkung, damit Mäuse. Es ergab sich kein Unterschied zwischen der nochmals mit Peroxyd allein angesetzten Kontrollreihe und der Hauptversuchsreihe; beide Male waren mindestens 2 mg Harnstoffhydroperoxyd erforderlich zur Zerstörung von 0,2 mg Tetanustoxin.

Versuchen wir nun, die Oxydationsmittel in ihrer Wirkung auf das Tetanustoxin gewissermaßen stöchiometrisch untereinander in Beziehungen zu bringen; es mag dies etwas gewagt erscheinen, da die Zahlen in den einzelnen Versuchsreihen nicht genügend eng festgestellt sind. Aus der Zusammenstellung ersehen wir, daß das Chloramid (Tolid) und das Hypochlorit (Caporit) die stärkste Wirkung ausüben, indem sie auf den, von ihnen zur Verfügung gestellten Sauerstoff berechnet, die etwa 220- bzw. 160fache Menge Tetanustoxin unschädlich machen; dann folgt das Permanganat mit der 125fachen Menge. Vom Persulfat und Hydroperoxyd (Ortizon) dagegen sind solche Mengen Sauerstoff erforderlich, daß auf ein Teil Toxin etwa 3/4 bis 1 1/2 Teile kommen. In den chlorabgebenden Substanzen ist also die zerstörende Wirkung etwa 200—300 mal so groß als im Wasserstoffperoxyd.

Es erscheint unmöglich, aus diesen vorgetragenen Untersuchungen auch nur irgendwelchen Schluß auf die Konstitution der oxydierbaren Gruppe im Tetanustoxin zu ziehen. Ebenso bleiben die Fragen offen, ob das mit diesen Oxydationsmitteln teilweise oder völlig unschädlich gemachte Tetanustoxin noch irgendwelche immunisierende Eigenschaften besitzt, ferner ob es durch geeignete Behandlung mit Reduktionsmitteln seine Giftwirkung wieder zurückerhält.

[A. 127.]

<sup>1)</sup> Die bisher mitgeteilten Ergebnisse sind ausführlich niedergelegt in den Arbeiten: G. Wesenberg und A. Hoffmann, Die Beeinflussung des Tetanustoxins durch einige oxydierend wirkende Körper. Zentralbl. f. Bakteriologie, Orig. 94, 416 [1925]. Auch A. Hoffmann, veter.-med. Diss. der Tierärztl. Hochschule Berlin 1925.

<sup>2)</sup> 10 mg Peroxydase hätten ausgereicht, um mindestens 10 mg der Harnstoff-Peroxydverbindung innerhalb 5 Minuten unter O<sub>2</sub>-Abspaltung zu zersetzen.