

113. Oskar Baudisch: Über Nitrat- und Nitrit-Assimilation¹⁾. VIII. Über Cholera. I.

(Eingegangen am 13. April 1916.)

Der Lebensprozeß des Choleravibrio ist mit einem starken oxydativen Abbau von Eiweiß-Substanz verbunden; wir müssen somit, um in das chemische Getriebe dieses Abbaues einen näheren Einblick zu bekommen, die Oxydationserscheinungen beim Eiweiß und beim Aminosäuren-Abbau näher ins Auge fassen. Diese oxydative Spaltung von Eiweiß-Substanz findet beim Choleravibrio speziell in schwach alkalischer Lösung statt, und somit ist es erklärlich, daß der Kommabacillus im Dünndarm, dessen Schleim alkalisch reagiert und dessen Inhalt aus Peptonen und Aminosäuren besteht, eine so massenhafte Entwicklung erfahren kann.

Die Choleravibrionen dringen dann, angezogen von der alkalisch reagierenden Schleimhaut und höchstwahrscheinlich auch zur Befriedigung ihres Sauerstoffbedürfnisses in die Schleimhaut ein, und wir wissen heute, daß die Abstoßung des Darmepithels nur durch den Krankheitserreger bzw. dessen Toxine hervorgerufen wird, somit als ein vitaler Vorgang aufzufassen ist.

Die Vibrionen schieben sich längs der Drüsenschläuche bis in die Submucosa vor, und es finden sich hier oft Reinkulturen von Choleravibrionen, die nun mit ihren giftigen Endotoxinen im Wege des Lymphstromes den ganzen Organismus überschwemmen und vergiften.

Dieses »stadium algidum« der Cholera, d. h. jene schweren Vergiftungserscheinungen, die sich durch Muskelschwäche, Cyanose, Coma, Herzschwäche, Kaltwerden der Extremitäten usw. bemerkbar machen, sind erst die Folge der in die Darmwand eingedrungenen Vibrionen. Daß die Bildung des Cholerasistos außerordentlich rasch erfolgen muß, hat schon Pfeiffer²⁾ experimentell nachgewiesen, nachdem es ihm gelang, mit minimalen Mengen etwa 18-stündiger Kultur durch intraperitoneale Injektion eine toxische Erkrankung von Meerschweinchen

¹⁾ I. Mitteilung: B. 44, 1009 [1911]. II. Mitteilung: Ber. d. Sitzung d. Schweiz. Naturforsch. Ges. 1911. III. Mitteilung: Zentr. f. Bakt., Abt. II, Bd. 32 [1912]. IV. Mitteilung: B. 45, 1775, 2879 und 3231 [1912]. V. Mitteilung: B. 46, 115 und 1744 [1913]. VI. Mitteilung: H. 89, 175 [1914]. VII. Mitteilung: Z. Ang. 26, 612 (Aufsatzteil). Zusammenfassung der 7 Mitteilungen: »Die Naturwissenschaft«, Springer (Berlin) 1914, Heft 9 und 10.

²⁾ Siehe z. B. Pfeiffer, Z. f. Hygiene, Bd. 11, 14, 16, 19. Deutsche med. Wochenschrift 1894, Nr. 13.

auszulösen, welche ohne Durchfall unter Muskelzuckungen und Rückgang der Körpertemperatur zum Tode führte.

Nach Ansicht der Serologen ist dieses furchtbare Gift ein hochkomplizierter Eiweißkörper, also ein sogenanntes echtes bakterielles Toxin.

Betrachtet man die hervorragenden Arbeiten von Abderhalden¹⁾ über die Verdauung von Eiweiß im Darm, so ergibt sich — wie Abderhalden des öfteren wiederholt —, daß die Aminosäuren im Mittelpunkt des Eiweiß-Stoffwechsels stehen, ja dieser eigentlich richtiger als Aminosäuren-Stoffwechsel zu bezeichnen wäre.

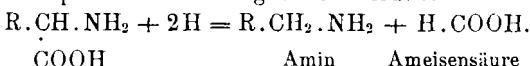
Schon aus diesem Grunde ist die Wahrscheinlichkeit gering, daß hochkomplizierte Eiweißverbindungen des Choleravibrio unabgebaut die Darmwand passieren und in die Blutbahn gelangen könnten.

Vom Standpunkt des Chemikers ist es viel naheliegender, daß Abbauprodukte der Vibrio-Zelle die Giftwirkung verursachen; diese Annahme wird auch experimentell durch die Arbeiten von L. Horowitz²⁾ dadurch stark gestützt, daß die toxischen Filtrate der auf eiweißfreiem Nährboden gewachsenen Kulturen keine Biuretreaktion gaben.

Um der Frage nach der chemischen Natur dieser Gifte nähergetreten zu können, müssen wir zunächst die primären Produkte der bakteriellen Tätigkeit kennen lernen. Wir können uns hier allerdings nur auf Analogieschlüsse verlassen, da exakte chemische Untersuchungen bisher fehlen. Der Choleravibrio ist dem ebenfalls Brechdurchfall erzeugenden *Proteus vulgaris* in vielen Beziehungen sehr ähnlich.

A. Berthelot³⁾ hat in seinen »Untersuchungen über den als Indol-Erzeuger geltenden *Proteus vulgaris*« angeführt, daß er in 57 verschiedenen Arten von *Proteus vulgaris* Hauser Indol-3-essigsäure nachweisen konnte, die höchstwahrscheinlich über das Indol-äthylamin gebildet wird. Indol-essigsäure scheidet sich nämlich im Harn aus, wie Versuche von A. J. Ewins und Mitarbeiter ergeben haben, wenn Indol-äthylamin entweder Hunden per os eingegeben wird, oder wenn man dieses Amin durch die Leber leitet⁴⁾.

Es ist dies aber nicht die einzige Art der Aminbildung; es kann auch durch Reduktion und Abspaltung von Ameisensäure das der Aminosäure entsprechende Amin gebildet werden:



¹⁾ Lehrbuch für physiol. Chem. 1914, III. Aufl. (Urban und Schwarzenberg).

²⁾ Zeitschr. Immunität 19, 44. ³⁾ C. r. 156, 641 (C. 1913, I, 1448).

⁴⁾ Biochemical Journ. 6, 141 [1911].

Eine derartige Bildung von Aminen im Cholera-vibrio-Stoffwechsel ist sogar sehr naheliegend, da durch den starken oxydativen Abbau von Kohlehydraten oder kohlehydrat-ähnlichen Gruppen des Eiweißmoleküls Wasserstoff gebildet wird, welcher auch gleichzeitig die in dem Kulturmedium anwesenden Nitrate reduziert.

Aminbildung ist in Bakterienkulturen überhaupt mehrfach beobachtet worden, so erinnere ich nur an das in der Darmschleimhaut nachgewiesene β -Imidazolyl-äthylamin¹⁾, welches, wie A. Berthelot²⁾ gezeigt hat, durch den *Bacillus aminophilus* aus Histidin gebildet wird.

Auch hier sind die Entstehungsbedingungen gleich denen bei Cholera, indem die Gegenwart von Säuren die Bildung des Amins verhindern oder doch sehr zurückdrängen.

Dieser *Bacillus* erzeugt aus Tryptophan Indol-äthylamin. Es ist überhaupt anzunehmen, daß die Wirkung solcher aminbildender Bakterien sich nicht nur auf einzelne, ausgewählte Aminosäuren beschränkt, sondern daß diese bakterielle Tätigkeit alle im Abbaugemisch vorhandenen Aminosäuren in gleicher Weise angreift. Es ist eine Tatsache, daß der Choleravibrio ein starker Indolbildner ist und sich besonders durch Raschheit der Bildung dieses Stoffwechselproduktes von anderen Indolbildnern, wie z. B. *Coli*, auszeichnet. Dadurch wird offen dargelegt, daß im bakteriellen Eiweißabbau des *Kommabacillus* speziell der Tryptophan-Stoffwechsel eine Rolle spielt. Neben dieser Eigenschaft ist noch eine andere beim Cholerabacillus hervorstechend, das ist die Nitritbildung.

Die experimentellen bakteriologischen Arbeiten begann ich vor dem Kriege mit *Pseudomonas europaea* und dem Nitrokokkus, das heißt Bakterien, welche imstande sind, Ammoniak zu salpetriger Säure zu oxydieren.

Es wurde dabei der Zweck verfolgt, die Zwischenstufe NOH , also die Stickstoffsäure oder das Nitroxyl zu fassen. Daß diese Verbindung, die ich früher bei Lichtreduktionen von Nitraten und Nitriten erhielt³⁾, hier entstehen würde, ist aus verschiedenen Gründen sehr naheliegend.

So erzeugen z. B. jene Bakterien, welche Nitrate abbauen, ein Gärungsgas, welches in der Zusammensetzung dem Gase, welches beim lichtchemischen Zerfall von Nitraten in Gegenwart von Aldehyden entsteht⁴⁾, analog zusammengesetzt ist. Aus einer Bouillon-Gartenerde-Kultur entwickelt sich ein Gasstrom mit mehr als 80 % Stick-

¹⁾ Journ. of Physiol. 41, 499; 45, 53 [1912]. ²⁾ C. 1912, II, 858. ³⁾ I. c.

⁴⁾ Siehe meine zitierten Arbeiten über Nitrat- und Nitritassimilation.

oxydul, so daß sich ein glühender Span darin entzündet. Eine Reinkultur von *B. pyocyanus* ergibt bei 37° ein Gärungsgas mit 65—72 % N_2O . Neben dem Stickoxydul bildet sich auch immer etwas Stickstoff und ferner kann man geringe Mengen Stickoxyd, NO sowohl bei dem Gärungsgas als auch beim »Lichtgas« nachweisen¹⁾.

Außerdem entstehen aber bei beiden chemischen Prozessen, d. h. bei der phytochemischen Gasbildung in Bakterienkulturen und bei der photochemischen Reduktion der Nitrate in Gegenwart von Alkoholen oder Aldehyden Spuren Blausäure, die mit dem Schönbeinschen Reagens oder mit dem Natriumpikrat-Papier nachgewiesen werden können.

Nachdem bei dem photochemischen Abbau sowohl das gebildete Stickoxydul als auch das Stickoxyd mit ziemlicher Sicherheit nur durch Zerfall der intermedial gebildeten Stickstoffssäure entstehen können:



so ist es naheliegend, das Gleiche bei dem phytochemischen Abbau der Nitrate durch Bakterien anzunehmen.

Ebenso ist es mit der Bildung der Blausäure. Bei dem photochemischen Abbau der Nitrate im Licht in Gegenwart von Aldehyden oder Alkoholen entstehen Aldoxime, die ja bekanntlich bei Oxydationsvorgängen leicht in die entsprechenden Nitrile zerfallen können.

So entsteht z. B. aus Formaldoxim Blausäure. Aus diesem Grunde war es naheliegend, unter den flüchtigen Produkten von Bodenbakterien-Kulturen sowohl nach Aldoximen als auch nach Blausäure und höheren Nitrilen zu fahnden.

Die Aldoxime könnten in Bodenbakterien-Kulturen durch Oxydation der primär gebildeten Amine entstehen. Auf rein chemischem Wege sind derartige Oxydationen in vielen schönen Arbeiten von Bamberger und seinen Schülern²⁾ ausgeführt worden. Daneben dürften aber auch Synthesen von Aldoximen aus Aldehyden und Hydroxylamin stattfinden, was mit der intensiveren Giftwirkung nitrat-haltiger Peptonwasser-Kulturen im engen Zusammenhang stände.

Die experimentellen Arbeiten zur Prüfung dieser Verhältnisse waren eben im Entstehen, als sie durch den Krieg abgebrochen werden mußten. Später hatte ich jedoch Gelegenheit, bakteriologische Stuhluntersuchungen zu machen, und ich konnte mich deshalb mit dem Bodenbacterium *Cholera* intensiver beschäftigen.

¹⁾ Siehe eine spätere Mitteilung über die Bedeutung des Magnesiums bei lichtchemischen Prozessen.

²⁾ B. 35, 4299 [1902].

Die Cholera-Vibrionen sind typische Nitritbildner und zwar wird die salpetrige Säure durch den Lebensprozeß des Cholera-Vibrio sowohl durch Reduktion gleichzeitig anwesender Nitrate erzeugt, wie auch umgekehrt im Stoffwechsel dieses sauerstoffbedürftigen Bacteriums salpetrige Säure aus Eiweißaminostickstoff durch Oxydation entsteht.

Diese Verhältnisse sind in der bakteriologischen Literatur oft erwähnt und oft bestritten; ich möchte die oben erwähnte Tatsache hier festlegen, da meine sorgfältigen Versuche mich einwandfrei zu diesem Resultate führten.

Gegenwart von Nitraten sind außerordentlich vorteilhaft für den Lebensprozeß des Cholera-Vibrio, und es wachsen die Bakterien in einer mit Kaliumcarbonat schwach alkalisierten, etwas nitrathaltigen Peptonlösung am besten und bilden am raschesten Aminosäuren und oxydative Abbauprodukte derselben. Der Dünndarm des Menschen ist somit besonders nach nitrathaltiger Kost ein außerordentlich günstiger Nährboden für die Cholera-Vibrionen.

Da der Cholera-Vibrio, wie schon früher erwähnt wurde, gewöhnlich auch sehr rasch aus dem Tryptophanrest Indol bildet und durch die Zugabe von Mineralsäure zu einer Cholera-peptonkultur eine rote Färbung, die sogenannte »Cholera-rot-Reaktion¹⁾« entsteht, so spielte diese als Nitrosoindol erkannte Rottfärbung in der Diagnostik früher eine bedeutende Rolle. Man kennt ja heute eine große Anzahl Indolbildender Bakterien, und die meisten von diesen können auch Nitrate zu Nitriten reduzieren. Beides tut ja auch unser für gewöhnlich harmloser Darmbewohner, Bacterium Coli.

Immerhin ist es ganz auffallend, wie rasch — besonders von frischen aus dem Darme von Choleraleichen gezüchteten Vibrionen — Pepton in dem Sinne gespalten wird, daß sowohl Nitrit als auch Indol im Verlaufe von wenig Stunden sich bildet. Viele Versuche mit verschiedenen Cholerastämmen neben den gewöhnlichen Coli-Bakterien und anderen Indol- und Nitritbildnern ließen mich diese Verhältnisse genau kennen lernen.

Der Cholera-Vibrio ist somit sowohl für das Studium des Nitratzerfalles als auch des oxydativen Aufbaues der Salpetersäure aus Ammoniak und Aminen sehr geeignet.

Inwiefern schon von jeher die starke Nitritbildung beim Cholera-Vibrio den Forschern auffiel, beweisen uns die von Pettenkofer²⁾ und seinen Schülern ausgeführten zahlreichen Arbeiten, welche darum,

¹⁾ Z. f. Bakt., I. Org. Bd. 40, 129; 50, 433.

²⁾ Emmerich: Max Pettenkofers Bodenlehre der Cholera, 1910.

daß die Cholera eine Salpetrigsäure-Vergiftung des menschlichen Organismus bewirkt. Emmerich, der eifrigste Verfechter dieser Theorie, konnte in der Tat sowohl im Dünndarmschleim von Choleraleichen als auch im Harn von Cholerakranken salpetrige Säure mit dem Griesschen Reagens einwandsfrei nachweisen.

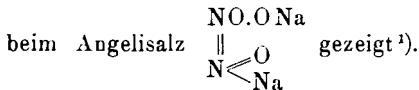
Für meine experimentellen Studien war zunächst die Feststellung der oxydativen Bildung von salpetriger Säure aus Aminstickstoff von Wichtigkeit.

Das gelang ganz einfach, indem man absolut nitrat- und nitritfreie Peptonwasserkulturen oder auch rein anorganische Nährsubstrate mit Cholera impfte und dann entweder durch Abdestillieren im Destillat oder auch direkt in der Kultur die salpetrige Säure mit *m*-Phenyldiamin oder Benzidin nachwies.

Bei den Destillationsversuchen ergaben sich zunächst eigene Erscheinungen. Wurde eine schwach Natronlauge alkalische Cholera-peptonkultur sorgfältig nach der Methode von Abderhalden¹⁾ im Vakuum destilliert, so zeigte das nach Indol und Ammoniak riechende Destillat auf Zusatz von verdünnten Mineralsäuren eine Rotfärbung, die manchmal außerordentlich intensiv war. Dieses Filtrat gab mit Benzidin oder *m*-Phenyldiamin, ferner auch mit Jodzink-Stärke keine Reaktion auf salpetrige Säure, sondern es entstand immer die gleiche Rotfärbung auf Zusatz von Säure. Erst als durch Schütteln mit reinstem Chloroform das Indol entfernt worden war, gab das wäßrige Filtrat alle Salpetrigsäure-Reaktionen intensiv. Es war also aus der deutlich natron-alkalisch reagierenden Pepton-Cholerakultur salpetrige Säure in verhältnismäßig großer Menge entwichen. Da aber auch gleichzeitig Ammoniak in der Cholerakultur gebildet wird und vorhandenes Ammoniumnitrit durch Dissoziation dampflich sein konnte, so wurde eine frische, nitrathaltige Pepton-Cholerakultur in zwei Teile geteilt und der eine Teil mit normaler Natronlauge in großem Überschuß versetzt und im Vakuum destilliert. Das Destillat enthielt nun zwar bedeutend weniger, aber immer noch deutlich nachweisbar salpetrige Säure und zwar nicht nur in der ersten Vorlage, sondern meistens auch in der zweiten, mit wenig destilliertem Wasser versehenen Saugflasche. Der zweite Teil, zu welchem nicht extra Natronlauge gegeben wurde, der aber auch deutlich alkalisch reagierte, enthielt im Destillat in der ersten Vorlage reichlich salpetrige Säure. Dagegen war in der zweiten Vorlage keine Nitrosoindol-Reaktion nachweisbar.

¹⁾ Siehe experimenteller Teil.

Diese Erscheinung ist ganz auffallend und beweist, daß aus einer Cholerakultur flüchtiges Stickoxyd NO herausdestilliert ist, welches in der Vorlage zu salpetriger Säure oxydiert wurde. Daß aus einer natron-alkalischen Lösung Stickoxyd neben Ammoniak abgespalten werden kann, habe ich — um ein Beispiel zu geben — seinerzeit



Wir müssen also annehmen, daß in einer Cholera-Pep-tonkultur die Stickstoffsäure = $\text{N} \text{---} \text{O} \text{---} \text{H}$ gebildet wird, die aber sehr rasch in NO und H bzw. Ammoniak zerfällt.

Salpetrige Säure konnte aus der stark natron-alkalischen Cholera-peptonkultur unmöglich entweichen. Ich habe mich zum Überfluß mit Blindversuchen, die Pepton und Natriumnitrit in verschiedener Menge enthielten, überzeugt.

Nachdem auf diesem indirekten Wege die Bildung der Stickstoffsäure erbracht wurde, so war es nabeliegend, anzunehmen, daß in einer Cholerapeptonkultur auch unter den flüchtigen Produkten Aldoxime oder deren Spaltungsprodukte (Blausäure oder Nitrile) vorhanden sein könnten.

Es wurden nun bei der Vakuumdestillation 4 Saugflaschen vorgeschaltet und wenig destilliertes Wasser in dieselben gegeben. In der der Pumpe anschließenden Saugflasche zeigte sich sehr oft, aber nicht immer, folgende Reaktion: Auf Zusatz von einer wäßrigen Indollösung zu dem vorgeschalteten Wasser und nachherigem Ansäuern mit Mineralsäure trat zuerst eine mehr oder weniger starke violettstichige Rötung und dann eine deutliche Trübung auf. Säurezusatz zu einer wäßrigen Indollösung gibt überhaupt keine Reaktion. Empfindliche Reaktionen auf Formaldehyd oder Acetaldehyd²⁾ in dem Destillat blieben negativ. Nur in einigen Fällen konnte Acetaldehyd mit Sicherheit nachgewiesen werden.

Es ergab sich nach vielen sorgfältigen Versuchen, daß die Aldoxime mit Indol diese oben angegebene Reaktion zeigen.

Reines Form- oder Acetaldoxim gibt beim Stehen mit Indol und verdünnten Mineralsäuren nach und nach eine Trübung, aber keine Spur einer Rötung. (Bildung von Aldehyd, der mit dem Indol in diesem Sinne reagiert.) Wenn man aber vorher die Aldoximlösung mit nitritfreiem Ammoniak alkalisiert, eine Zeitlang stehen läßt und

¹⁾ B. 46, 115 [1913].

²⁾ Empfindliche Reaktion auf Acetaldehyd s. H. 83, 105.

dann Indol und Mineralsäure zugibt, so entsteht je nach der Dauer der Einwirkung des Ammoniaks eine mehr oder minder stark violettstichige Rotfärbung und dann nach und nach Trübung¹⁾.

Diese Reaktion ist für aliphatische Aldoxime außerordentlich charakteristisch und empfindlich. Ihr Wesen wird in der nächsten Abhandlung noch genauer ausgeführt werden.

Diese Reaktion trat öfters — nicht immer — im destillierten Wasser des letzten Saugkolbens auf; sie weist darauf hin, daß in einer Cholerapeptonkultur außerordentlich flüchtige Aldoxime gebildet werden. Ob Form- oder Acetaldoxim in der Vorlage oder beide neben einander entstanden sind, sollen weitere Versuche unterscheiden. Die Produkte zu fassen, stößt auf große Schwierigkeiten, weil die Aldoxime im Vakuum so außerordentlich flüchtig sind und gewöhnliche Destillation zu keinem Resultat führte. Wird dagegen die Cholerapeptonkultur neutralisiert bezw. ganz schwach organisch sauer oder mineralsauer gemacht und dann wieder einige Zeit im Brutschrank bei 37° belassen, so gelingt es mit Hilfe des Schönbeinschen Reagens und mit Hilfe von Pikrinnatrium-Papier²⁾, in der durch die Kultur hindurchgeblasenen Luft Blausäure nachzuweisen, die höchstwahrscheinlich, wie anfangs erwähnt wurde, aus dem Formaldoxim gebildet wird.

Außer den hier angegebenen experimentellen Befunden weist noch eine andere Beobachtung darauf hin, daß in einer Cholerapeptonkultur neben salpetriger Säure einfache Kohlenstoff-Stickstoff-Sauerstoff-Verbindungen gebildet werden.

Viele Versuche mit Cholerapeptonkulturen ließen auch mich erkennen, daß ein Zusatz von Natrium- oder Kaliumcarbonat zu der Nährlösung und ein gewisser geringer Prozentsatz Nitrat, die Cholera-rot-Reaktion besonders schön und intensiv erscheinen läßt. Man bekommt oft tiefviolette Lösungen durch Zusatz von mäßig konzentrierter Salzsäure zu den Peptonkulturflüssigkeiten, welche 24 bis 48 Stunden im Brutschrank standen. Diese tiefvioletten Färbungen halten sich, wie ich mich überzeugt habe, Tage und Wochen lang.

Versuche mit Witte-Peptonlösung und verschiedenen Nitritmen- gen ergeben nie eine derartige tiefviolette, haltbare Färbung, und es ist zweifellos, daß neben der gewöhnlichen Nitrosoindolbildung noch andere weinrote bis violette Farbstoffe nach dem Ansäuern der Cholerapeptonkultur entstehen, die kein Nitrosoindol darstellen. Der Lösung

¹⁾ Über den Mechanismus der Reaktion s. Über Nitrat- und Nitrit-Assimilation. IX, S. 1176 ff.

²⁾ C. 1908, I, 975.

dieser Frage kam ich näher, als ich das Verhalten des Nitromethans und der Aldoxime gegen Indol studierte¹⁾.

Ich habe früher über eine neue Indolreaktion mit Nitromethan berichtet. Es entstehen hier, wie ich in der nächsten Abhandlung näher ausführen will, zweifellos sowohl mit Nitromethan als auch mit Aldoximen Indylmethanfarbstoffe, die je nachdem ein, zwei oder drei Indylreste in das Methanmolekül eintreten und sich mit ein, zwei oder drei Säuremolekülen zu Salzen binden, verschiedene Nuancen zeigen.

Auf welchem Wege diese Indylmethanfarbstoffe sich in einer Cholerakultur bilden, läßt sich vor der Hand noch nicht sicher entscheiden, da sowohl eine Bildung über den Indolaldehyd als auch eine solche über Indol und Nitromethan bezw. Aldoxim möglich ist. Auf jeden Fall wird man die Anschauung, daß die Cholerarot-Reaktion ausschließlich auf einer Nitrosoindolbildung beruht, ändern müssen. Nitrit gibt nur in außerordentlich starker Verdünnung mit wäßriger Indollösung eine violettstichige rote Färbung, die gegen Säure nicht sehr beständig ist. Nimmt man konzentrierte Nitritlösungen, so ist der Farbenton rein orange. Viele Forscher, die sich mit der Cholerarot-Reaktion beschäftigt haben, geben eine mehr oder minder stark ins Violette gehende Rotfärbung an, die in der stark sauren Lösung sehr beständig ist.

Daß amerikanische Forscher Blausäure beim *B. pyocyaneus*²⁾ und bei andern Bodenbakterien nachgewiesen haben, fand ich erst nach Abschluß meiner experimentellen Befunde beim Zusammenschreiben dieser Arbeit. Ob eine Entstehung von Blausäure im Dünndarm des Cholerakranken, dessen Schleimhaut, wie Emmerich nachwies, durch freie salpetrige Säure und durch gebildete organische Säuren sauer reagiert, von ausschlaggebender Bedeutung für die Choleravergiftung ist, läßt sich zunächst noch nicht bejahend beantworten. Immerhin gibt die Entstehung von so giftigen flüchtigen Substanzen, wie Stickoxyd, Aldoxime, Blausäure und höchstwahrscheinlich auch Nitrite, eine Erklärung, warum — wie Ruata³⁾ nachwies — eine in einem offenen Gefäß erhitzte Cholerapeptonkultur schon bei 100° ihre Giftigkeit verliert, während, wenn sie im geschlossenen Gefäß auf 120° erhitzt wird, ihre Giftigkeit beibehält. Ruata erhielt auch intensive Giftwirkungen bei Meerschweinchen mit Cholerapeptonkultur-

¹⁾ Siehe die folgende Abhandlung: »Über Nitrat- und Nitrit-Assimilation. IX.

²⁾ B. J. Clawson u. C. C. Young, Journ. of Biol. Chem. 15, 419—422.

³⁾ Zentr. f. Bakt. u. Paras.

Destillaten, konnte jedoch in diesen außer Ammoniak keine toxische Substanz finden. In neuester Zeit wurde von L. Horowitz nachgewiesen, daß die Filtrate der in eiweißfreien Nährmedien gezüchteten Choleravibrionen bei Meerschweinchen eine Erkrankung hervorrufen, die ganz ähnlich der durch tote Choleravibrionen bedingten ist. Ferner zeigte L. Horowitz¹⁾, daß solche toxischen Filtrate keine Biuretreaktion geben, somit nicht eiweißartiger Natur sind, sondern vielmehr Abbauprodukte der Vibrio-Zelle darstellen müssen. Weitere Untersuchungen werden speziell die Frage berücksichtigen, inwieweit phytochemische Oxydationen von Aminstickstoff in der Pathologie der Infektionskrankheiten von Bedeutung sein können.

Experimenteller Teil.

Zum Impfen der Nährösungen verwendete ich frische Cholerakulturen, die mir in liebenswürdiger Weise von Hrn. Professor Küster vom Hygienischen Institut und von Hrn. Professor Dr. E. Fränkel vom Eppendorfer Krankenhaus zur Verfügung gestellt wurden, wofür ich hier nochmals bestens danke.

Als Nährösung wurde 1% Peptonwasser, welches 0.5% NaCl und auf 100 ccm 2 ccm $\frac{1}{10}$ -NaOH enthielt, angewandt, dem wechselnde Mengen K_2CO_3 und KNO_3 zugesetzt wurden.

Dabei wendete ich folgende einfache Methode an:

Die Peptonlösung wurde im Reagensglas sterilisiert und erst kurz vor dem Gebrauch das KNO_3 und K_2CO_3 mittels Capillaren hinzugegeben. Dabei wurde folgendermaßen verfahren. In die sterile wäßrige Stammlösung von 4 g KNO_3 und 1 g K_2CO_3 in 100 ccm destilliertem Wasser wurden feine, gleichmäßig dicke (Schmelzpunktsröhren) Capillaren, die man vorher einige Male durch die Flamme zieht, eingetaucht und hierauf in das Peptonröhren hineingeworfen. So konnte man je nach dem eine oder mehrere Capillaren zugeben und ersparte dadurch die Verwendung steriler Pipetten bzw. die Herstellung mehrerer Lösungen von verschiedenem KNO_3 - und K_2CO_3 -Gehalt.

Die Kulturen wurden in einen 37° warmen Brutschrank gebracht und gewöhnlich nach 48 oder nach zweimal 48 Stunden verarbeitet. Längeres Wachstum bietet keine Vorteile, es treten im Gegenteil dann oft lästige Nebenprodukte auf. Die Kulturen wurden nach der Methode von Abderhalden destilliert, in der bekannten Weise, daß die Nährösung nur Tropfen für Tropfen in dem evakuierten Kolben verdampfte, welcher in 75—80° heißes Wasser eintauchte. Der Kolben war mit einem langen Kühler verbunden, der in eine mit Eis gekühlte Vorlage endigte. Zwischen dieser Vorlage und der Vakuum-Pumpe waren noch zwei Saugflaschen eingeschaltet, die nur wenig destilliertes Wasser enthielten. Das klare Destillat roch bei den Peptonwasserkulturen stets nach Indol, Ammoniak und Aminen. Verwendete

¹⁾ l. c.

man reines, absolut nitrat- und nitritfreies Peptonwasser als Nährflüssigkeit, so waren die in einem Peptonröhren gebildeten Nitritmengen äußerst gering. Immerhin konnte man deutlich ersehen, daß dieses Nitrit nur auf oxydativem Wege aus Aminen oder Ammoniak entstanden sein konnte.

Verwendete man drei Peptonröhren mit je drei Capillaren Stammlösung, so bekam man im Destillat auf Zusatz von verdünnter Schwefelsäure oder auch mit Phosphorsäure beim Erwärmen eine starke Cholerarot-Reaktion, obwohl weder mit Jodzink-Stärke noch mit Griessschen Reagenzien eine Spur salpetriger Säure nachzuweisen war.

Wurde jedoch das Destillat mit Chloroform, welches vorher auf salpetrige Säure genau geprüft worden war, ausgezogen und dadurch das Indol entfernt, so erhielt man deutlich die Reaktion auf salpetrige Säure mit Jodzink-Stärke. Es war somit aus der alkalischen Cholerakultur in bedeutenden Mengen salpetrige Säure übergegangen, was nur in Form von Stickoxyd möglich sein kann.

Wurde die Cholerakultur vor der Destillation mit normaler NaOH stark alkalisch gemacht, so war in dem Destillat trotzdem salpetrige Säure nachzuweisen, und zwar oft noch in der zweiten Vorlageflasche.

In der Vorlageflasche an der Saugpumpe dagegen war salpetrige Säure nicht mehr vorhanden, trotzdem gab diese wäßrige Lösung auf Zusatz von Ammoniak und Indol zuerst eine schwache Rotfärbung und weiße Trübung.

Da von vornherein das Augenmerk auf Aldoxime verwandt wurde, wurden Form- und Acetaldoxime auf ihre Reaktion mit Indol geprüft und in der Tat die gleiche Reaktion mit sehr verdünnter Form- oder Acetaldoximlösung gefunden.

Die Versuche sind sehr oft mit dem gleichen Resultat wiederholt worden; immerhin wäre es viel vorteilhafter, wenn man im Anschluß an ein Choleraspital mit ganz frischen stark virulenten Kulturen und mit viel größeren Mengen arbeiten könnte, um die flüchtigen Produkte in Substanz fassen zu können.

Die Bildung der Blausäure oder Blausäure enthaltenden Verbindungen konnte aus der alkalischen Cholerakultur niemals beobachtet werden. Erst auf Zusatz von sehr wenig Milchsäure oder auch anorganischen Säuren, so daß die Kultur zumindestens neutral oder schwach sauer reagierte, entwich nach und nach aus der im Brutschrank stehenden Kultur ein Gas, welches die Schönbeinsche HCN-Reaktion gab und Natriumpikratpapiere rötete.

Ausführliche experimentelle Belege des bakteriologischen Teiles werden später an anderer Stelle gegeben werden.

Alle Mittel zu dieser Arbeit wurden mir in außerordentlich liebenswürdiger Weise von Hrn. Dr. Oskar Tropowitz zur Verfügung gestellt, dem ich auch an dieser Stelle dafür bestens danken möchte. Ferner danke ich Hrn. Obermedizinalrat Prof. Dr. A. Nocht, welcher die Güte hatte, mir im Bakteriologischen Laboratorium des Tropeninstituts in Hamburg einen Arbeitsplatz zur Verfügung zu stellen.