種々なる酸素張力が抗酸性菌の 發育に及ぼす影響に就いて

長崎醫科大學細菌學教室（主任阿部教授）

醫學士 青 木 義 勇

「内容抄録」 結核菌は酸素含有量の 大な肺臓に、癩菌は同含有量の 小な皮膚及び粘膜内に其の主臓器親和性を有する事は衆知の事實であつて、又同じく結核菌と雖も人型、牛型、鳥型、冷血動物結核菌間に其の差異ある事も否む事は出来ない。然るが故に抗酸性菌の各々は其發育に際し酸素を必ずしも同一の張力で要求しないといふ想像は強ち無根の推定ではあるまい。

著者は各種抗酸性菌16株（人型、牛型、鳥型、蛙各結核菌、BCG、ケドロウスキー氏、クレグ氏、渡邊氏各所謂癩菌、著者が昭和6年春古木某男癩結節より分離せる抗酸性菌、鼠癩菌、チモテー菌、恥垢菌等の各原株及び近時其原株との生物學的性狀、毒力の差異によつて興味を持たれて居る解離せられた所謂Δ型結核菌、BCG、チモテー菌）を選び、ハーリス氏法に従ひ培養試験管内に種々の張力（50mm, 100 mm, 150 mm, ……1 氣壓）の酸素を封入し、發育を観察し同時に集落形成、菌體變形、抗酸性度の變化等を参考とし、其發育に必要な張力の限界を決定した。（菌株の來歴、各菌株の發育に最適な培地の撰定、ハーリス氏酸素封入裝置及操作、抗酸性度測定法及び成績等詳細は獨文原著参照）

結論として

（1） 酸素の存在は抗酸性菌の發育に必要不可欠である。

（2） 酸素張力の範圍は種々である先づ原株（解離せられざる）に就いて云へば、其範圍可成り限局せられたるもの（各種結核菌、所謂癩菌中渡邊氏菌、青木菌、鼠癩菌及び恥垢菌）と廣く微量より殆ど純酸素中に至るまで殆ど同程度に旺盛に發育するもの（所謂癩菌中ケドロウスキー氏菌、クレグ氏菌及びチモテー菌）とある。解離せられた抗酸性菌は原株より廣範圍の酸素要求を持つ。之は未だ先進諸家の報告にも接しない甚だ興味ある兩型間の1新差異點である。

（3） 過重な或は不足な酸素張力下に屢、集落及び色素形成異常を認める。特に興味あるのは低壓下に人型及び牛型結核菌が示す異常集落形成であつて、本現象と前述解離抗酸性菌の新特性とを併せ考察する時は低壓酸素張力下に於ける抗酸性菌解離の可能性を豫想

（1）

する事が出来る。本異常集落は多少濕潤し表面又比較的圓滑, S 型化の傾向が認められる。

(4) 顯微鏡的形態の變化及び抗酸性度の變化は認め得ない。

(5) 最適酸素張力の位置に就いて比較すれば人型及牛型結核菌は高く, 鳥型, 蛙結核菌, 所謂癩菌, 鼠癩菌は低いか或は其範圍廣く兩者間に亘る。抗酸性菌の臟器親和性に關し本成績は理論的説明の 1 根據たり得る。詳細は獨文に譲る。

(本業績は其要旨を昭和 7 年 6 月長崎醫學會第 65 回例會席上に發表せり)

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS DER VERSCHIEDENEN SAUERSTOFFSPANNUNGEN AUF DAS WACHSTUM SÄUREFESTER BAKTERIEN.

(EINE NEUE BIOLOGISCHE CHARAKTERISTIK DER "DISSOZIIERTEN" TUBERKEL-UND TIMOTHEEBAZILLEN)*

VON

Yoshio Aoki

(Aus dem bakteriologischen Institut der medizinischen Universität zu Nagasaki-
Vorstand: Prof. Dr. T. Abe)

Einleitung

Es ist eine von vielen Forschern festgestellte Tatsache, dass der Sauerstoff zum Wachstum der Tuberkelbazillen unbedingt erforderlich ist. Der Frage des Sauerstoffbedarfs durch quantitative Untersuchungen näher zu treten, gibt es jedoch bisher nur wenige Arbeiten, z. B. die von Novy und Soule, von Ishikawa und von Kirchner.

Novy und Soule⁽³⁾ untersuchten, welche O_2 -Menge im Reagenzglas dem Wachstum förderlich bzw. schädlich ist, und stellten optimalen O_2 -Gehalt als 40-50% fest. Nach Ishikawa⁽⁴⁾ wachsen die Tuberkelbazillen wohl auch bei grösserer O_2 -Spannung als bei der der atmosphärischen Luft, aber eine bedeutend gesteigerte Menge von O_2 dagegen schädlich. Kirchner⁽⁵⁾ hat fast gleiche Resultate veröffentlicht. Nach ihm haben die Tuberkelbazillen einen ausgesprochenen O_2 -bedarf, und die optimale O_2 -Konzentration für ihr Wachstum sollte etwa 45% sein. Er berichtet ferner, dass die Tuberkelbazillen auch in 100% O_2 zu gedeihen vermögen, jedoch ihr Wachstum dabei ausserordentlich verschlimmert wird.

* Nach einem auf der 65. Tagung der medizinischen Gesellschaft zu Nagasaki, in Juni 1932, gehaltenen Vortrag.

Auf Grund obiger Literaturangaben ersieht man mit grossem Interesse, dass sich die Tuberkelbazillen unter vollem O_2 -Abschluss nicht vermehren und nur unter dem Vorhandensein des O_2 wachsen können, wenn auch die Stärke und die Schnelligkeit des Wachstums je nach dem Gehalt des O_2 verschieden ist. Da der Tuberkelbazillus beim Eindringen in den Körper seinen zum Stoffwechsel nötigen O_2 nicht mitbringt, wird sein weiteres Ergehen davon abhängen, wieviel davon und wie er ihn im Körper findet und weiterhin beziehen kann. Darüber ist weiter kein Wort zu verlieren, dass in der Lunge das grösste O_2 -Angebot gegeben ist. Bei stark forzierter Einatmung kann der O_2 -Gehalt der Lunge dem der Atmosphäre, nämlich 20.9% fast gleichkommen. Die Lunge ist, was ja auch bekannt ist, der Ort der Erkrankung bei den allerverschiedensten tuberkulösen Infektionsarten.

Es gibt Leprabazillen, Rattenleprabazillen, Hühner- und Kaltblütertuberkelbazillen und saprophytische Säurefesten, die sämtlich auch zu der Gruppe der säurefesten Bazillen gehören und nach ihrem ganzen Verhalten als zu dem nächsten Verwandten des Tuberkelbazillus gehörig zu bezeichnen sind. Wir haben bisher unter den verschiedenen Publikationen über den Tuberkelbazillus noch keine einzige Arbeit über den Einfluss der verschiedenen O_2 -Spannungen auf das Wachstum der Leprabazillen u. a. getroffen, besonders vom vergleichenden Standpunkt.

Es ist eine allgemein bekannte, von Anfang an genügend betonte Tatsache, dass die Leprabazillen in der Haut oder in der Schleimhaut, speziell der Nase, eindringen, wo sie lange Zeit liegen bleiben können, und dass von der Stelle der ersten Invasion die Weiterverbreitung auf dem Lymph- oder auf dem Blutwege vor sich geht, dass schliesslich bei älteren Leprafällen sich fast stets bazillenhaltige Knötchen in Milz und Leber vorfinden. Die Haut besitzt einen verhältnismässig geringen Stoffwechsel, ihre O_2 -Abgabe beträgt nur 1.5 %, der O_2 -Durchtritt nur 1 %, der durch die Lungen eindringenden Gasmenge.

Als besondere Form der menschlichen tuberkulösen Infektionsarten steht die Tuberkulose der Haut und der Schleimhaut da. Die Frage über die Identität der Tuberkelbazillenarten im Falle von Lungen- und von Hauttuberkulose ist zumal in den letzten Jahren häufig Gegenstand von wissenschaftlichen Erörterungen gewesen. Die geringe Neigung des Lupus, auf andere Organe überzugehen, und die Beobachtung, dass die Krankheit jahrzehntelang bestehen kann, ohne zu einer tödlichen Infektion des Gesamtorganismus Veranlassung zu geben, ferner einige bakteriologische Untersuchungs-

ergebnisse, nämlich dass bei Lupus sehr häufig sogenannte atypische Kulturen gefunden werden, vor allem aber auch Stämme mit stark verabgesetzter Virulenz, haben zu der Vermutung geführt, dass es sich bei dieser Hauttuberkulose um eine Infektion durch einen degenerativ veränderten, an veränderte Lebensbedingungen angepassten atypischen Tuberkelbazillus handelt. Bezüglich auch der Leprabazillen fanden wir ganz ausnahmsweise lepröse Lungeninfektion, die sich vermutlich durch Anpassung der Leprabazillen an das sauerstoffreiche Organgewebe erklären lässt.

Im allgemeinen—mit Ausnahme der sehr selten beobachteten Anpassungserscheinungen—zeigen die Tuberkelbazillus, zum mindesten in den früheren Stadien der Infektion, eine besondere Affinität zur Lunge, die mit O_2 reichlich versorgt ist, und die Leprabazillen zur Haut, die sauerstoffarm ist. In bezug auf den Rattenleprabazillus kann man gleiche Verhältnisse annehmen.

Bei Infektion durch andere tierische Tuberkelbazillen scheint auch die Eigentümlichkeit der Organ-Affinität zu Tage zu treten. Hühnertuberkelbazillen lassen zuerst in der Lunge, ferner in der Milz starke Veränderungen (Knotenbildung) auftreten, im Gegensatz zu Säugetiertuberkelbazillen, die hauptsächlich zur Lunge spezifische Affinität zeigen. Ebenfalls von dem Säugetiertuberkelbazillus artverschieden ist der als Erreger der Fisch-, Schildkröten-, Frosch- und Schlangentuberkulose bezeichnete Mikroorganismus, welcher zuerst in einem Tumor eines Karpfen gefunden wurde. In bezug auf den Frosch ist er pathogen: bei Impfung in den Rückenlymphsack gehen die Frösche in einigen Wochen zugrunde und weisen tuberkelartige, zum Teil verkäste Knoten in den inneren Organen, besonders Leber und Netz auf.

Ausser den soeben besprochenen Mikroorganismen gibt es noch eine ganze Reihe von saprophytischen Säurefesten, die dem Tuberkelbazillus in ihrem morphologischen Aussehen und ihre Säurefestigkeit sehr ähnlich sind. Man findet solche Bakterien z. B. nicht selten in Milch und Butter sowie auf Mist. Es gibt ausserdem auch die unter dem Namen "Smegmabazillus" bekannten unpathogenen Säurefesten, die auf der Schleimhaut in der Nähe der Harnröhrenmündung vegetieren.

Schliesslich fragten wir uns, ob die Leprabazillen u. a. zu ihrem Wachstum andere spezifische O_2 -Spannungen, als die Tuberkelbazillen bedürfen. Und es erschien daher erforderlich, das O_2 -Bedürfnis der säurefesten Bakterien vergleichend zu studieren.

Methodik

Für die ganze Reihe von Versuchen wurden die verschiedenen Typen des Tuberkelbazillus (Typus humanus, bovinus, gallinarum, Froschtuberkelbazillen sowie BCG-Kulturen), ferner 4 sogenannte Leprabazillen d. h. säurefeste Bazillen von Kedrowsky, Clegg, Watanabe sowie der von mir Juli 1931 aus dem Knoten eines leprösen Menschen gewonnene Stamm, 1 Rattenleprabazillus, 2 Timotheebazillen und 1 Smegmabazillus, als Ausgangsmaterial gewählt. Einige dieser Stämme hatten wir aus den bakteriologischen Instituten der Universitäten zn Kyoto, Kyushu, Osaka, Mukden, Keio (Tokyo) und Niigata sowie aus dem Kitasato-Institut liebenswürdigerweise erhalten, wofür ich an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank ausspreche.

Tabelle I. Übersicht über die geimpften Säurefestenstämmen.

Nr.	Bakterienstamm	Abkürzung des Stammes	Stammnummer unseres Instituts
1	Tuberkelbazillen (Typus humanus) "Naga"	Th.	79
2	S-Form der humanen Tuberkelbazillen "Tb 16" *	Th 16 S.	171
3	BCG-Kultur "BCG 371" **	BCG 371.	173
4	S-Form des BCG-Kultur "BCGE" *	BCGES.	172
5	Tuberkelbazillen (Typus bovinus) "Keio"	Tb.	80
6	(Typus gallinarum) "Kyushu"	Tg.	81
7	Froschtuberkelbazillen "Niigata"	Tr.	166
8	Sogenannte Leprabazillen von Kedrowsky	Ked.	119
9	" " von Clegg	Cl.	120
10	" " von Watanabe ⁽¹⁷⁾ "Chrome"	Wa.	122
11	" " von Aoki "Furuki"	Ao.	139
12	Rattenleprabazillen "Uchida-A" ⁽¹⁶⁾	Rl.	95
13	Timotheebazillen "Osaka"	TiO.	162
14	S-Form der Timotheebazillen "Osaka" ***	TiO.S.	189
15	Timotheebazillen "Kyoto"	TiK.	170
16	Smegmabazillen "Osaka"	Sm.	161

* von Prof. Toda im mikrobiologischen Institut der japanischen Universität zu Mukden bezogen und nach Angabe dieses Autors aus einem seit langem (etwa 10 Jahre) im staatlichen Institut für experimentelle Therapie, Frankfurt am Main auf Eiernährboden fortgezüchteten humanen und einem aus derselben Quelle stammenden Calmetteschen Stamm mit Hilfe von Ultraviolettstrahlen abgetrennt ⁽¹⁴⁾

** der im obengenannten Institut zu Frankfurt am Main lange Gallen-Kartoffel-Nährbodenpassagen durchgemacht hatte.

*** die von mir im Januar 1932 auf Eiernährboden nach Löwenstein aus Timotheebazillen "Osaka" abgetrennte S-Kolonie.

Zur Bestimmung des O_2 -Bedarfs in Reagenzglasversuchen liegt es nahe, einen Mastab für die Breite der maximalen und minimalen O_2 -Spannungen in ihrer Wirkung auf das Wachstum beimpfter Bakterien zu suchen. Für die Ausführung des Versuchs, in einem Kulturröhrchen O_2 von verschiedenen Spannungen einzuschliessen, sind einige Methoden anwendbar. Ich entschied mich bei meinen Versuchen für die von Harris⁽²⁾ angewandte Methode.

Der verwendete Apparat besteht aus einem Reagenzrohr mit Gummipropf, einer Wasserpumpe, einem Manometer und einem Entwickler mit Behälter von O_2 ; er ist schematisch in Textfigur abgebildet.

Kulturröhrchen. (K) Ich habe gehärtete Reagenzgläser (16 cm × 18 cm), die als "Nakano N" bezeichnet sind, gewählt.

Gummipropf. (G) Gummipropf Nr. 3, der zu oben erwähntem Reagenzglas genau passend ist, wurde vorbereitet. Man lässt in der Mitte ein Loch von 6 mm Durchmesser machen und steckt eine Glasröhre von etwa 15 cm (E), die in der Mitte eine Verjüngung besitzt, hindurch; man bereitet eine Anzahl solcher Gummipropfe vor, sterilisiert und bewahrt sie in einem grösseren Glasgefäss.

Paraffinwachs. Empfehlenswert ist Paraffinwachs für den Gummipropf, um dessen Feststellung an die Glaswand noch dichter zu machen.

Wasserpumpe. (P) Sie wurde mit einem Quecksilbermanometer (M) verbunden.

Quecksilbermanometer. (M) Er ist sehr einfach aufzustellen, indem ein Glasrohr von etwa 800 mm Länge in einem mit Quecksilber erfüllten Gefäss (Q) aufgerichtet wird. Das Rohr wurde der Höhe nach entsprechend der Differenz der beiden Quecksilberoberfläche mit Kerben von 1—14, nämlich 1 an der Stelle 710 mm, 2 an der Stelle von 660 mm, 3 an der Stelle von 610 mm usw. bis 14 an der Stelle von 60 mm bezeichnet.

Apparat zur Aufbewahrung der O_2 . Wir benutzten einen Kippschen Apparat (R) und eine mit Wasser zur Hälfte erfüllte grosse Flasche (W), welche durch ein Seitenrohr einander kommunizierten. Der Kippsche Apparat ist mittels eines Hahns (D) mit dem O_2 -Entwickler (S), mittels eines anderen Hahns (C) mit einem Verbindungsrohr zwischen Nährboden und Wasserpumpe verbunden. Bei Erwärmung einer Mischung von Kalium chloricum und Braunstein kann man leicht reinen O_2 herstellen.

Ich will um folgenden die von mir selbst dabei angewendete Technik in ihren Einzelheiten beschreiben.

Die mit erwärmtem Paraffinwachs bestrichenen Gummipropfe steckt man fest in die beimpften Kulturröhrchen hinein, dabei wird der Wattepropf in das Rohr etwas hineingedrückt.

Die Röhrchen sind als 0, 1, 2, 15 numeriert, und wie folgend behandelt.

Röhrchen Nr. 0. Mittels der Wasserpumpe wird Luftentfernung ausgeführt, indem man Hahn (A) und (B) öffnet und (C) schliesst. Entsprechend der Luftverdünnung steigt die Quecksilbersäule auf und erreicht schliesslich den manometrischen maximalen Punkt (durchschnittlich 754.5 mm am

Nov., 756.2 mm am Dez. 1931, 757.9 mm am Jan., 754.4 mm am Feb., 1932 in Nagasaki); das ist ein Beweis, das die Luftentfernung vollständig ist. Man schmilzt das Glasrohr (E) mit der Flamme, schneidet es ab und bringt es in den Thermostat.

Röhrchen Nr. 1. Nach Luftentfernung wird Hahn (A) geschlossen. Hahn (C) sorgfältig geöffnet und O₂ langsam hereingelassen bis das Quecksilber im Manometer bis an den Strich 1 gefallen ist. Dann mit Flamme geschmolzen und in den Thermostat gestellt. O₂-Spannung, dieses Rohres ist etwa 50 mm.

Bezüglich der anderen Röhrchen wird Luftentfernung und O₂-Einschliessung von verschiedenen Spannungen in der gleichen Weise ausgeführt. Schliesslich kann man folgende Reihe der Kulturröhrchen aufstellen:

Röhrchen Nr.	2=O ₂ -Spannung	100 mm	Röhrchen Nr.	3=O ₂ -Spannung	150 mm
„ Nr. 4=	„	200 „	„ Nr. 5=	„	250 „
„ Nr. 6=	„	300 „	„ Nr. 7=	„	350 „
„ Nr. 8=	„	400 „	„ Nr. 9=	„	450 „
„ Nr. 10=	„	500 „	„ Nr. 11=	„	550 „
„ Nr. 12=	„	600 „	„ Nr. 13=	„	650 „
„ Nr. 14=	„	700 „	„ Nr. 15=	reiner	O ₂

Vorversuche

Bei der Prüfung des Bakterienwachstums auf künstlichem Nährboden unter verändertem gasigem Medium muss man theoretisch einen zum Wachstum der betreffenden Bakterien höchst geeignet bedingten Nährboden auswählen.

Um diesen Zweck zu erreichen, führten wir erst die folgenden vergleichenden Bebrütung aus; dabei wurden 14 von verschiedenen Forschern als Anreicherungs- oder Fortzüchtungsnährmedium für säurefeste Bakterien empfohlene Nährböden angewandt, nämlich eiweissfreier Nährboden nach Proskauer u. Beck, Glycerinagar, Glycerinmilkagar, Glycerinkartoffel nach Calmette, Mohrrübensaftnährboden nach Watanabe,⁽⁷⁾ Heydenagar nach Hesse, erstarrtes Serum nach R. Koch, erstarrtes Serum mit Zusatz von Glycerin nach Nocard u. Roux, Eiernährboden nach Dorset,⁽¹⁾ Eiernährboden nach Petroff,⁽¹⁰⁾ Eiernährboden nach Sonnenschein,⁽¹³⁾ Eiernährboden nach Löwenstein,⁽⁷⁾ Eiernährboden nach Hohn⁽³⁾ und Eiernährboden nach Petragunani.⁽⁹⁾

Man beobachtet das Wachstum der Bakterien und stellte diejenigen Röhrchen als die geeignetesten () fest, in welchen die Kolonien frühest und deutlichst auftreten.

Tabelle II. Vergleichende Wachstumsprüfung der Säurefesten auf verschiedenen Nährmedien.

Stämme	Th	Th 16S	BCG 371	BCG ES	Tb	Tg	Tr	Ked	Cl	Wa	Ao	Rl	TiO	TiOS	TiK	Sm
Bebrütungsdauer (Tage)	28	28	28	28	28	8	14	14	7	7	7	10	4	4	7	2
Proskauer u. Beck	+	—	—	±	±	±	±	+	±	±	+	±	±	+	+	+
Glyzerinagar	±	±	—	±	±	+	+	±	+	±	±	+	±	±	+	(+)
Glyzerinmilchagar	—	—	—	—	—	+	±	±	+	±	±	+	±	±	±	+
Glyzerinkartoffel	—	—	—	—	—	±	±	±	+	+	+	±	±	±	±	+
Watanabe	—	—	—	—	—	±	±	+	+	+	+	±	±	+	±	+
Heydenagar	±	—	±	—	±	±	±	±	+	±	+	±	±	±	+	+
Koch	±	—	—	—	—	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	+
Nocard u. Roux	—	—	—	—	—	±	±	±	±	—	±	±	±	±	±	+
Dorset	—	±	+	+	—	±	±	±	+	—	±	+	+	+	+	+
Petroff	±	±	±	±	±	+	+	+	(+)	±	+	+	+	+	+	+
Sonnenschein	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+
Löwenstein	±	+	±	+	±	+	(+)	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	+
Hohn	±	±	±	±	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+
Petragnani	+	+	±	+	±	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+

Zeichenerklärung: + Deutliches Wachstum, ± spurweises Wachstum, — kein Wachstum.

Wie aus Tabelle II ersichtlich ist, sind im allgemeinen die Farbstoff enthaltenden Eiernährböden—mit Ausnahme der in allen Medien üppig schleimig wachsenden Smegmabazillen—gute Nährmedien für das Wachstum säurefester Bazillen, überdies gibt ihre Färbung einen sehr geeigneten Hintergrund, so dass sie die wachsenden Kolonien deutlicher für das Auge abheben. Die Einzelheiten sind: für Th. Th16S. BCG371. BCGES. und Tg. der Sonnenscheinsche Malachitgrün-Eiernährboden, für Wa. Ao. und Rl. der von Petragnani ausgedachte Malachitgrün-Milch-Kartoffel-Eiernährboden, für Tr. TiO, TiOS sowie TiK der Löwensteinsche Kongorot-Kartoffel-Eiernährboden, für Cl. der Petroffsche Gentianaviolett-Eiernährboden und für Ked. der Hohnsche Z-Eiernährboden (Hämatin-Malachitgrün-Eiernährboden).

Wir müssen hier die Kulturcharakteristika der einzelnen säurefesten Stämme auf die betreffenden geeignetsten Nährböden kurz beschreiben:

Th. (28 Tage alte Kultur) Unregelmässig begrenzt, leicht kriechend, mittelhoch, trocken und runzelig. (Sog. R-Kolonie) Leicht sahnfarbenes Aussehen.

Th16S. (28 Tage alte Kultur) Rund, feucht, ähnlich den Erythrozyten: der Rand ist erhoben und die Mitte vertieft. (S-Kolonie)

- BCG371. (28 Tage alte Kultur) Fast gleich wie Th. (R-Kolonie)
- BCGES. (28 Tage alte Kultur) Rund, glatt, feucht. (S-Kolonie)
- Tb. (28 Tage alte Kultur) Fast gleich wie Th. Etwas gelblicher als bei Th. (R-Kolonie)
- Tg. (8 Tage alte Kultur) Farblos, vollständig rund, mittelhoch, ähnlich einer Mottelkugel mit feuchter Oberfläche; sie liess sich leicht zur Suspension verreiben. (S-Kolonie)
- Tr. (14 Tage alte Kultur) Unregelmässig begrenzt, mit unglatter Oberfläche, trocken, fast farblos. (R-Kolonie)
- Ked. (14 Tage alte Kultur) Sehr klein, rund, mittelhoch, feucht. (S-Kolonie)
- Cl. (7 Tage alte Kultur) Breit, kriechend, mit höherer Mitte, trocken. (R-Kolonie) Zitronenfarbe von Anfang an deutlich gebildet.
- Wa. (7 Tage alte Kultur) Ziemlich gross, rund, feucht. (S-Kolonie) Zitronenfarbe etwas dunkler als bei Cl.
- Ao. (7 Tage alte Kultur) Breit, kriechend, mit erhabener Mitte, trocken. (R-Kolonie) Keine Pigmentbildung. Bemerkenswert ist, dass die Kolonie des Ao. sehr verschiedenartig ist je nach der Art des Nährbodens.
- Rl. (10 Tage alte Kultur) Fast gleich wie Ao. (R-Kolonie) Nur ein Unterschied besteht, insofern als bei Ao. deutliche Neigung zur Sekundärkoloniebildung als Rl. vorhanden ist.
- TiO. (4 Tage alte Kultur) Breit, kriechend, trocken. (R-Kolonie) Zitronenfarbe wird gebildet.
- TiOS. (4 Tage alte Kultur) Rund, feucht, ähnlich kleinen Bällen. (S-Kolonie) Zitronenfarbes Aussehen.
- TiK. (7 Tage alte Kultur) Breit, kriechend, trocken und hoch runzelig. (R-Kolonie) Zitronenfarbe ist etwas rötlicher als bei Tio.
- Sm. (2 Tage alte Kultur) Üppig, schleimig, feucht. (S-Kolonie) Keine Farbstoffbildung.

Hauptversuche

Zu unseren Untersuchungen benutzte ich 16 Säurefestenstämmen, welche auf den in meinem Artikel über die Vorversuche ausgewählten Nährböden wachsen. Bei der Beimpfung dieser Bakterien muss man möglichst einzeln die suspendierten Emulsionen austreichen, um das Wachstum der einzelnen Kolonien genau zu beobachten.

Zu diesem Zweck benutzte ich die Technik von Petroff⁽¹¹⁾ oder die von Toda.⁽¹⁴⁾ Ich verriert die Bakterienkultur mit physiologischer Kochsalzlösung sorgfältig im Mörser unter möglichst sterilen Kautelen und filtrierte dann nach Toda mit gehärtetem Filterpapier von Schleicher und Schüll Nr. 575; das Suspensionsfiltrat enthielt fast nur einzelne Bazillen.

Anf den für den Hauptversuch vorbereiteten Kulturröhrchen (schräg gelegtes Medien von Mengen von etwa 5 ccm) wurden, nach vorangegangener nochmaliger

Erhitzung (zwei Zwecke lagen dabei vor, nämlich nochmalige Sterilisierung und Entfernung der spurweise in den Nährmedien enthaltenen Luft), die Bakteriensuspensionen beimpft. Dann schloss man nach der Harrisschen Methode O_2 von verschiedenen Spannungen in die Röhren ein, stellte sie in den Brutofen und beobachtete sie täglich auf ihr Wachstum. Zeigte sich Wachstum auf der Mediumfläche in den Röhren, so stellte ich durch makroskopische und mikroskopische Prüfung 1) Wachstumsgrad, 2) Kolonieformation, 3) Farbstoffbildung, 4) Zellmorphologie sowie, 5) Säurefestigkeit im Vergleich mit Kontrollröhren genaue Beobachtungen an und trug in die folgende Übersichtstabelle den Befund mit Abkürzungen ein.

Zur Prüfung der Säurefestigkeit verwandte ich die von mir etwas modifizierte quantitative Ziehl-Neelsensche Färbungsmethode. Meine Methode besteht im Folgenden: 1) dünn verstreichen auf Objektträgern, die als Nr. 1, 2, 3,..... nummeriert sind; 2) lufttrocken werden lassen, Fixation in Flamm; 3) färben 3 Minuten lang in mit erwärmter Ziehlscher Lösung (etwa $80^\circ C$) erfülltem Farbkasten, welcher in Wasserbad gestellt ist; 4) Farbe abfließen lassen, dann einweichen in 3%igem salzsaurem Alkohol, jedes Röhren 10 Sekunden, 30 Skd., 1 Minute, 2 Min., 3 Min., 5 Min., 10 Min., 15 Min., 20 Min. und 30 Min. lang; 5) Wasserspülen, trocknen, mikroskopieren, danach notieren als Säurefestigkeitskoeffizient (S) die Nummer derjenigen Grenzfestigkeit, bei welcher eben noch eine gute Säurefestigkeit stattfindet.

Die Säurefestigkeitskoeffizienten (S) der von mir benutzten, auf geeignetesten Nährböden gut gedeihenden 16 Stämme sind wie folgt: Th. 8, Th16S. 10, BCG371. 10, BCGES. 10, Tb. 6, Tg. 10, Tr. 3, Ked. 5, Cl. 4, Wa. 7, Ao. 6, Rl. 7, TiO. 3, TiOS 3, TiK 2 und Sm. 6.

Die hierbei erzielten Ergebnisse sind in folgenden Tabellen zusammengestellt.

Zur Beurteilung der Untersuchungsergebnisse und schliesslich zur Feststellung der optimalen O_2 -Konzentration für das Wachstum der 16 säurefesten Bakterien, werden wir zunächst eine Betrachtung geben.

Wir bringen zuerst die Grenze der zum Wachstum notwendigen O_2 -Spannungen. Th. 350—760 mm, Th16S. 100—700 mm, BCG371. 300—700 mm, BCGES. 100—760 mm, Tb. 350—600 mm, Tg. 150—550 mm, Tr. 100—250 mm, Ked. 100—760 mm, Cl. 50—700 mm, Wa. 350—500 mm, Ao. 200—350 mm, Rl. 150—350 mm, TiO. 150—350 mm, TiOS. 50—760 mm, TiK. 100—760 mm und Sm. 200—450 mm.

Tabelle III.

Stämme		Th	Th16s	BCG371	BCGES	Tb	Tg	Tr
Bebrütungsdauer (Tage)		28	28	28	28	28	8	14
Nr. 0	O ₂ -frei	W K F M S	W K F M S	W K F M S	W K F M S	W K F M S	W K F M S	W K F M S
Nr. 1	50 mm	± - - - 8	-	-	-	-	-	-
Nr. 2	100 mm	± - - - 8	+ - - - 10	-	+ - - - 10	± ± - - 6	± - - - 10	+ - - - 3
Nr. 3	150 mm	+ + - - 8	± - - - 10	± - - - 9	± - - - 10	+ + - - 5	+ - - - 10	± - - - 3
Nr. 4	200 mm	± - - - 8	+ - - - 10	± - ± - 10	± - - - 10	± ± - - 6	± - - - 10	± - - - 3
Nr. 5	250 mm	+ - - - 8	+ - - - 10	± - ± - 10	± - - - 10	± - - - 6	± - - - 10	± - - - 3
Nr. 6	300 mm	+ - - - 8	+ - - - 10	+ - ± - 10	+ - - - 10	+ ± - - 6	± - - - 10	-
Nr. 7	350 mm	± - - - 8	+ - - - 10	+ - + - 10	+ - - - 10	± - ± - 6	± - - - 10	-
Nr. 8	400 mm	± - + - 9	+ - - - 10	+ - + - 10	+ - - - 10	+ - + - 6	± - - - 9	-
Nr. 9	450 mm	± - ± - 9	+ - - - 10	+ - + - 10	+ - - - 10	+ - + - 6	± - - - 10	-
Nr. 10	500 mm	± - + - 8	± - - - 10	+ - + - 10	+ - - - 10	± - + - 5	± - - - 10	-
Nr. 11	550 mm	± - ± - 9	+ - - - 10	+ - ± - 10	+ - - - 10	± - ± - 6	+ - - - 10	-
Nr. 12	600 mm	± - ± - 9	+ - - - 10	+ - + - 10	+ - - - 10	± - + - 6	± - - - 10	-
Nr. 13	650 mm	± - + - 8	+ - - - 10	+ - ± - 10	+ ± - - 10	± - - - 6	-	-
Nr. 14	700 mm	± - + - 9	+ - - - 10	+ - + - 10	+ + - - 10	-	6	-
Nr. 15	reiner O ₂	± - - - 8	-	± - - - 10	+ + - - 10	-	6	-
Kontrolle		W F S (+)(+)(8)	W E S (+)(-)(10)	W F S (+)(+)(10)	W F S (+)(-)(10)	W F S (+)(+)(6)	W F S (+)(-)(10)	W F S (+)(-)(3)

Zeichenerklärung: W.....Wachstum, K.....Veränderte Koloniformation,
 F.....Farbstoffbildung, M.....Morphologische Variation,
 S.....Säurefestigkeitskoeffizenz

Fassen wir zusammen, so ergibt sich auf der einen Seite ein beschränktes (z. B. Tr. Wa. Ao. Rl. TiO), ein mässig beschränktes (Th. BCG371. Tb. Sm.), auf der anderen Seite aber ein weites O₂-Bedürfniss (Th16S. BCGES. Tg. Ked. Cl. TiOS. TiK.)

Wie bekannte, zeigen der Tuberkelbazillus und dessen nächste Verwandten in nährstoffarmen Kulturmedium bei ungünstigen Entwicklungsbedingungen gewisse Variation der Kolonieformation und der Zellmorphologie sowie Unstabilität der Säurefestigkeit. So muss ich bei der Beurteilung der Ergebnisse nicht nur die einfache Beobachtung des Wachstums der Bakterien, sondern auch einige weitere Besonderheiten bezüglich der Kolonieformation, der Farbstoffbildung, der Morphologie sowie Säurefestigkeit genau berücksichtigen, ehe ich die optimalen O₂-Spannungen der betreffender Bakterien festzustellen versuche. Denn das Wort "optimum" ist begrifflich bestimmt, dass damit ein Grad der äusseren Lebensbedingungen ausgedrückt ist, bei welchem die Lebenstätigkeit der Organismus am intensivsten verläuft, ohne dass ihre Lebenserscheinungen beeinflusst werden.

Kolonieformation. Man kann veränderte Kolonieformation in unserer ganzen Reihe von Versuchen nur wenig finden: Th. Tb. und Ked. in niedrigen Spannungen, und BCGES in hohen Spannungen. Hochinteressant ist die Kolonieformation der humanen und bovinen Tuberkelbazillen in Röhrchen von niedrigen Spannungen.

Wie im Vorversuch beschrieben, wuchsen bei Th. oder Tb. nach 4-wöchlicher Kultur sogenannte R-Kolonie mit unregelmässigem Rand, unglatter Oberfläche und leichter Neigung zur Verbreitung auf einer Oberfläche von Malachitgrün-Eiernährboden nach Sonnenschein. Dagegen bilden die in beiden Reagenzgläsern Nr. 3 auftretenden, 4 Woche lang gedeihenden Kolonien eine besondere Formation, nämlich vergleichend kleine, fast rundliche, oberflächlich etwas gratte, zur Isolierung neigende Kolonien mit leichter Feuchtigkeit, während die von Röhrchen Nr. 7, 8, 9 u. a. ganz gleich wie die des Kontrollröhrchens sind. Mikroskopisch-morphologisch gibt es jedoch keine merklichen Unterschiede zwischen den Kolonien der beiden Gruppen der Röhrchen.

Ein wertvoller Beitrag in der Frage über die Unstabilität und die Variabilität der Tuberkelbazillenarten ist die neuerdings von Petroff⁽¹¹⁾ und seine Mitarbeitern, Kraus u. Gerlach,⁽⁶⁾ Tscheknowitzer,⁽¹⁵⁾ Seiffert⁽¹²⁾ sowie Toda⁽¹⁴⁾ mitgeteilte Feststellung der Abtrennungsfähigkeit (Dissoziation) von Reinkulturen. Sie kamen zum Schluss, dass sich aus einem humanen Tuberkelbazillenstamm, aus einem bovinem Stamm, aus einem Geflügeltuberkelbazillen und endlich aus dem BCG-Stamm je zwei Formen von Kolonien

abtrennen liessen, welche sie nach ihrem Aussehen R (rough) und S (Smooth) benannten.

Ich kann nicht mit Sicherheit sagen, dass die von mir in Röhrechen von niedrigen O_2 -Spannungen auftretenden Kultur mit der von Petroff u. a. benannten sogenannten S-Kolonie identisch sind. Jedenfalls geht klar hervor, dass diese Kolonien eine atypische Form darstellen: mit anderen Worten, es befindet sich von den Wachstum zeigenden Röhrechen nur Röhrechen Nr. 7, 8, 9, u. a. unter optimalen Bedingungen.

In bezug auf die veränderte Kolonieformation bei BCGES. und Ked. können wir diese leider nicht durch Dissoziation erklären, weil die atypische Kolonie eine etwas grössere weiche Form mit vermehrter Feuchtigkeit (S-Kolonie) aufweist, während die typische Kolonie eigentlich eine S-Kolonie ist.

Farbstoffbildung. Dass in der Tat die Farbstoffbildung der Bakterien keine unveränderliche Eigenschaft darstellt, dass sie von den äusseren Wachstumsbedingungen d. h. Sauerstoff, Temperatur, Licht, Ernährungsweise u. a. abhängig ist, und dass bei O_2 -Abschluss oder unzulänglichem O_2 -Angebot auch farblose Kulturen nachgewiesen werden können, haben die bisherigen Arbeiten über Pigmentbakterien bereits gelehrt. Umgekehrt, wenn der Pigmentbazillus negativ oder abgeschwächte Farbstoffbildung zeigt, kann man sagen, dass sein Wachstum nicht auf die günstigste O_2 -Spannung eingestellt ist.

Es gibt 7 farbstoffbildende Stämme unter den von mir benutzten 16 Stämmen, Th. BCG371, Tb. Cl. Wa. TiO und TiK: hier zeigte Th. BCG371, Tb. Cl. und Wa. unter hoch geschwächten oder verstärkten O_2 -Spannungen, geringe oder fast negative Farbstoffbildung. Bei den beiden Timotheebazillen ist die Farbstoffbildung fast gleichgrädig, von Spuren bis zu 100%iger Konzentration gehend. Das ist ein Beweis davon, dass die Timotheebazillen unabhängig von der O_2 -Spannung üppig gedeihen können.

Die Untersuchung über die *zellmorphologische Variabilität* und die Unstabilität der *Säurefestigkeit* ergab keinen merklichen positive Resultate. Also ist es zwecklos, mit den Resultaten dieser beiden Prüfungen unsere Untersuchung über die optimale Spannung zu schliessen.

Als Zusammenfassung meiner Untersuchungen stellte ich die maximalen, die minimalen sowie die optimalen Spannungen der betreffenden Bakterien fest. Wir bringen dieselben in Form einer folgenden schematischen Figur.

Besprechung und Deutung der Resultate

In meiner Einleitung vermutete ich auf Grund der Literaturangaben erstens eine erweiterte Grenze des O₂-Bedürfnisses, zweitens dass der optimale Punkt beim Wachstum des humanen sowie des bovinen Tuberkelbazillus in hoch gesteigerten Spannungen erreicht wird, und drittens dass die optimale Entwicklungsmöglichkeit des Geflügel- und des Froschtuberkelbazillus sowie der Leprabazillen bei vergleichungsweise geringeren O₂-Spannungen gegeben ist; von diesen drei Vermutungen ausgehend, suchte ich das Wesen der Organspezifität der Tuberkel- und Leprabazilleninfektion zu erklären.

Wie erwartet, führte meine Untersuchung zum Schluss, dass die R-Form der humanen und bovinen Tuberkelbazillen (Th. BCG371.) nur ein mässig erweitertes O₂-Bedürfnis haben, und dass der optimale Punkt in hoch gesteigerten Spannungen erreicht wird, während dasjenige der Kaltblütertuberkelbazillen ebenso wie das der sogenannten Leprabazillen im allgemeinen deutlich beschränkt und in geringerer

Spannung liegend ist; nur 2 Ausnahmen fanden sich von der Regel, nämlich Ked. und Cl., deren Grenze des O₂-Bedürfnisses ausserordentlich erweitert ist.

Jedenfalls ist es möglich, mit den Ergebnissen meiner Untersuchungen über die Zusammenhänge zwischen den O₂-Bedingungen und dem Verhalten der humanen und bovinen Tuberkelbazillen im Reagenzglas im Vergleich mindestens mit dem Verhalten von Froschtuberkelbazillen, Rattenleprabazillen, Watanabeschen sowie Aokischen Bazillen die Frage nach der Organ-Affinität gegenüber Tuberkelbazillen theoretisch zu lösen.

Fassen wir zunächst die Ergebnisse im Sinne der 2 Arten von Kolonieformation zusammen, so ergibt sich bezüglich der humanen Tuberkelbazillen und einer von den 2 Timotheebazillen die folgende hochinteressante Tatsache, dass die S-förmigen Stämme d. h. Th16S, BCGES., sowie die von mir im Januar 1932 auf Löwensteinschem Eiernährboden aus dem Timotheebazillus "Osaka" abgetrennte S-Kolonie einen ausgesprochen erweiterten O₂-Bedarf haben, während der R-Kolonien ziemlich beschränkt ist, was ich als eine neue biologische Charakteristik der dissoziierten Tuberkel- und Timotheebazillen hinstellen möchte.

Eine andere von mir beobachtete bemerkenswerte Eigenschaft, die gleichzeitig einen neuen Standpunkt zur Erklärung dieser Eigentümlichkeit bietet, ist das Verhalten der Th. und Tb. unter herabgesetzten O₂-Spannungen. Wir können nicht mit Sicherheit sagen, dass diese Kolonie mit der sogenannten S-Kolonie ganz identisch ist, jedoch glauben wir an die Möglichkeit der Dissoziation von Th. und Tb. unter solchen O₂-Bedingungen. Die Dissoziation der säurefesten Bakterien unter herabgesetzten O₂-Spannungen ist eine Frage, mit deren Untersuchung wir zur Zeit gerade beschäftigt sind.

Es ist nötig an dieser Stelle noch kurz über die etwaige Stammesverwandtschaft der von mir benutzten sogenannten Leprabazillen und ihre Stellung innerhalb der säurefesten Bakteriengruppe auf Grund meiner Feststellung des O₂-Bedürfnisses ein Wort zu sagen: die Stämme Kedrowsky und Clegg stehen in dieser Hinsicht den durch ein weites O₂-Bedürfnis charakterisierten Timotheebazillen nahe. Der Stamm Aoki ist ähnlich den Rattenleprabazillen. Den von Watanabe gezüchteten Stamm konnte ich nicht einreihen.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, meinem teuren Lehrer Herrn Prof. T. Abo für alles Entgegenkommen und alle Hülfe meinen herzlichen Dank auszusprechen.

Zusammenfassung

Es wurden an säurefesten Bakterienarten (verschiedene Typen von Tuberkelbazillen, sogenannte Leprabazillen, Rattenleprabazillen, Timotheebazillen und Smegmabazillen) Untersuchungen über den Einfluss der verschiedenen Sauerstoffspannungen auf deren Wachstum angestellt, wobei der Wachstumsgrad, die Kolonieformation, die Farbstoffbildung, die Zellmorphologie sowie die Säurefestigkeit genau beobachtet wurden. Auch an der von Prof. Toda abgetrennten S-Form des humanen und des BCG-Stammes sowie an dem von mir abgetrennten S-förmigen Timotheebazillus wurde die Prüfung vergleichungsweise ausgeführt.

Die angeführten Untersuchungen berechtigen uns zu folgenden Schlüssen:

- 1) Der Sauerstoff ist zum Wachstum der säurefesten Bakterien unbedingt erforderlich.
- 2) Es bestehen zwischen dem Verhalten des O_2 -Bedarfs der einzelnen originalen (nicht dissoziierten) Stämme recht erhebliche Unterschiede. Im allgemeinen haben die verschiedenen Tuberkelbazillenarten, die Rattenleprabazillen und die Smegmabazillen einen ziemlich beschränkten O_2 -Bedarf, während der der Kedrowskyschen und der Cleggschen sogenannten Leprabazillen und der Timotheebazillen sehr gross ist. Die S-förmig dissoziierten Tuberkel- und Timotheebazillen sowie BCG-Stämme stehen an O_2 -Bedarf den Kedrowskyschen Bazillen u. a. nahe.
- 3) Man kann bisweilen in niedrigen und hohen O_2 -Spannungen veränderte Kolonieformation und Farbstoffbildung finden. Hochinteressant ist die Tatsache, dass die humanen und bovinen Tuberkelbazillen unter herabgesetzten Spannungen atypische zur S-Formation neigende Kolonien aufweisen.
- 4) Die Untersuchung über die zellmorphologische Variabilität und die Unstabilität der Säurefestigkeit ergab keinen merklichen positiven Resultate.
- 5) Was die optimalen Spannungen für das Wachstum der Säurefesten anbelangt, so können wir dies bezüglich feststellen, dass bei originalen humanen und bovinen Tuberkelbazillen der optimale Punkt in hoch gesteigerten Spannungen erreicht wird, dagegen bei Kaltblütertuberkelbazillen ebenso wie bei sogenannten Leprabazillen dieser Punkt im allgemeinen in geringeren Spannungen gelegen ist. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, die Frage nach der Organ-Affinität gegenüber Tuberkel- und Leprabazillen theoretisch zu lösen.

Literaturverzeichnis

- (1) Dorset, Zentralbl. f. Bakt. 1 Abt. Ref., Bd. 33. S. 276. 1903.
 - (2) Harris, Journ. of Path. a. Bact., Bd. 23. Nr. 1. S. 38. 1919.]
 - (3) Hohn, Zentralbl. f. Bakt. 1 Abt. Orig., Bd. 121. S. 488. 1931.
 - (4) Ishikawa, Kekkaku., Bd. 6. Nr. 5. S. 527. 1928.
 - (5) Kirchner, Beitr. z. Kl. d. Tbc., Bd. 68. S. 527. 1928.
 - (6) Kraus u. Gerlach, Zschr. f. Immun. forschg., Bd. 61. S. 454. 1929., Bd. 62. S. 339. 1929.
 - (7) Löwenstein, Dtsch. med. Wschr., S. 1010. 1930.
 - (8) Novy a. Soule, Journ. of Inf. Dis, Bd. 36. S. 168. 1925.
 - (9) Petragunani, Zentralbl. f. Bakt. 1 Abt. Ref., Bd. 85. S. 554. 1927.
 - (10) Petroff, Steenken u. Schnieder, Beitr. z. Kl. d. Tbc, Bd. 74. S. 499. 1930.
 - (12) Seiffert, Zschr. f. Immun. forschg., Bd. 74. S. 116. 1932.
 - (13) Sonnenschein, Zentralbl. f. Bakt. 1 Abt. Orig., Bd. 117. S. 284. 1931.
 - (14) Toda, Zschr. f Hyg., Bd. 112. S. 463. 1931., Journ. of Oriental Med., Bd. 15. No. 1. S. 23. 1931.
 - (15) Tscheknowitzer, zit. aus Kraus u. Gerlach.
 - (16) Uchida, Saikingaku-Zasshi, Nr. 328. S. 1. 1923.
 - (17) Watanabe, Harasawa a. Ono, Tokyo-Iji-Shinshi, Nr. 2709. S. 16. 1931., Kitasato Arch. of Exp. Med., Bd. 8. Nr. 3. S. 303. 1931.
-