Glukosamin und pathogene Bakterien.

I. Mitteilung.

Über die Differenzierung der pathogenen Staphylokokken durch ihr
Glukosamin spaltendes Vermögen und über ihre Virulenz-
steigerung auf Glukosaminnährboden.

Von

Masahiko Kuroya und Masatosi Kurose.

(黒屋 政彦)

(黒瀬 正敏)

(Aus dem Bakteriologischen Institut der Kaiserlichen
Tohoku Universität zu Sendai, Direktor:
Prof. Dr. M. Kuroya.)

Studien über die Beziehung zwischen Glukosamin und Bakterien finden sich ziemlich zahlreich vor, aber deren grösserer Teil beschränkt sich nur auf biochemisches Gebiet und nur mit einigen Ausnahmen ist unseres Wissens fast keine Untersuchung bakteriologisch gemacht worden.

Im Jahre 1913 stellten Abderhalden und Fodor¹⁾ mit einem aus verdorbenem Pankreas gezüchteten Stamm von *B. subtilis* einen Versuch an, um über den Einfluss dieser Bakterien auf Glukosamin Näheres in Erfahrung zu bringen. Im Anschluss daran studierte Meyer^{2) 3)} unter Benutzung eines Nährbodens, der aus einer Kaseinlösung und Glukosamin-HCl bestand und im Gärungskolben verteilt war, die Einwirkung verschiedener Bakterien auf Glukosamin-HCl.

Im Jahre 1928 aus dem Ergebnisse ihrer Experimente über das Verhalten von Diphtheriebazillen und ihnen nahe verwandten Bakterien gegen Glukosamin konnten Noble und Knacke⁴⁾ keine Beziehung zwischen ihrer Zersetzungswirkung auf Glukosamin und Toxinproduktion herausfinden. Andererseits berichtete Takao⁵⁾ (1923), dass d-Milchsäure in einer glukosaminhaltigen Kulturflüssigkeit durch Colibazillen gebildet wurde, und Imaizumi⁶⁾ (1937), dass aus d-Glukosaminsäure durch Colibazillen d-Milchsäure und Bernsteinsäure, durch Paratyphus-B-Bazillen nur Bernsteinsäure gebildet wurden. Im Jahre 1935 isolierte Suhara⁷⁾ aus einer Pilzkultur (*Penicillium glaucum*) Glukosamin-HCl als einen Teil der Hydrolyseprodukte.

Ausser den eben erwähnten liegen noch viele Arbeiten über Glukosamin vor, aber diejenigen, die mit Bakterien zu tun haben,

sind nur selten. Besonders ist bis jetzt, ausser dem einfachen Experiment, worin sich Meyer^{2) 3)} mit je einem Stamm von *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* und *Pneumococcus* beschäftigte, noch kein Versuch an Staphylokokken mitgeteilt worden. Unsere Aufmerksamkeit wurde also darauf gerichtet, dass unter den Bakterienleib zusammensetzenden Proteinfractionen das sog. Glukoproteid einen wichtigen Anteil einnimmt und Glukosamin, eins der Hauptbestandteile der prosthetischen Gruppe dieses Glukoproteids, einen etwaigen Einfluss auf Mikroorganismen ausüben müsste, wenn es, ihrem Nährboden zugesetzt, ihnen zugänglich gemacht wird.

Herstellung des Glukosamins und die zum Experiment gebrauchten Staphylokokkenstämme.

Eine grosse Menge von Krabbenschalen wurde über Nacht in 10%iger, roher HCl eingetaucht, um sie vollständig zu entkalken. Darauf kochte man sie eine Zeit lang mit 30%iger HCl in einer Abdampfschale, löste den Rückstand in einer genügenden Menge Was-

Tabelle 1.

Zum Experiment gebrauchte 24 Stämme von Staphylokokken.

Stämme	Quelle der Stämme	Isolierungsdatum	Arten der Staphylokokken
204	Subkutane Phlegmone	18/V, 1926.	<i>St. aureus</i>
205	Osteomyelitis tibiae	20/V, 1926.	"
259	Panaritium	29/IV, 1927.	"
260	Otitis media acuta	9/II, 1940.	"
263	Hüftgelenkeiterung	11/II, 1940.	"
338	Parotitis acuta	13/XII, 1927.	"
405	Lymphadenitis purulenta	27/VJ, 1930.	"
476	Traumatische Gangraen	20/V, 1934.	"
534	Osteomyelitis femoris	15/III, 1937.	"
Hosi	Otitis media acuta	15/II, 1940.	"
297	Osteomyelitis tibiae	20/VIII, 1927.	?
490	Lymphadenitis acuta	5/VII, 1934.	?
288	Hämaturie	19/VII, 1927.	<i>St. albus</i>
317	Myositis purulenta	28/X, 1927.	"
319	Subkutane Abscess d. Montgomery'schen Drüse	4/XI, 1927.	"
320	Ohrfurunkel	10/XI, 1927.	"
475	Kontusion	16/V, 1934.	"
3	Luftkeim	25/II, 1940.	"
4	"	"	"
6	"	1/III, " 1940.	"
7	"	"	"
8	"	4/III, " 1940.	"
I	"	25/II, 1940.	<i>St. citreus</i>
II	"	4/III, 1940.	"

ser und entfärbte die Lösung mit Tierkohle. Die in solcher Weise gewonnene, fast farblose, klare Lösung dampfte man auf einem Wasserbad ein, um Glukosamin-HCl als Krystalle zu erhalten. Nach einmaliger Umkrystallisierung aus Wasser wurde es in Gestalt eines weissen Pulvers gewonnen, das man in Aq. dest. auflöste, und nach Neutralisation mit NaOH durch Berckefeld-Filter filtrierte. Die keimfreie, farblose Lösung fügte man dem Nährboden gewöhnlich in einer Konzentration von 0,5% hinzu.

Unter den 24 Staphylokokkenstämmen, die uns zur Verfügung standen, befanden sich 17, die aus verschiedenen Eiterherden früher oder frisch herausgezüchtet und verschieden lang in unserem Laboratorium aufbewahrt waren, die übrigen 7 dagegen waren erst kürzlich aus der Luft isoliert. Die Quelle und das Isolierungsdatum dieser Stämme sind in Tabelle 1 angezeigt.

Verschiedene biologische Einflüsse von Glukosamin-HCl auf Staphylokokken.

a. Einfluss auf Bakterienform.

Aus obigen 24 Stämmen von Staphylokokken wurden 6 Stämme beliebig ausgewählt und auf 0,5% glukosaminhaltiger Agarplatte wie auch auf gewöhnlicher Agarplatte bei 37°C, 24 Stunden lang gezüchtet, und beide Kulturen wurden bis zur 10ten Generation wiederholt. Die in solcher Weise erworbenen Bakterien hatte man mit Gram- und Fuchsinfärbungen auf ihre Formen vergleichend beobachtet, und dabei ergab sich, dass bei beiden Kulturen morphologisch fast keine Unterschiede erkennbar waren.

b. Schleimige Veränderung und Wachstumsbeförderung der Staphylokokken auf Glukosaminnährboden.

Die auf dem glukosaminhaltigen Nährboden gezüchteten Staphylokokkenkolonien sahen im Vergleich mit den auf gewöhnlichem Agar gezüchteten deutlich zäh und schleimig aus, und diese Zähigkeit und Schleimigkeit steigerten sich desto höher, je mehr Glukosamin dem Nährboden zugesetzt und je mehr Generationen auf diesem Nährboden entwickelt wurden. Das Wachstum der Staphylokokken wurde auch durch Zusatz des Glukosamins in geeigneter Konzentration (0,5%) erheblich gesteigert.

c. Einfluss auf Bakteriensenkungsgeschwindigkeit.

Von zwei ausgewählten Staphylokokkenstämmen, welche einerseits auf glukosaminhaltigem Nährboden und andererseits auf gewöhnlichem Nährboden ohne Glukosamin 10mal nacheinander fortgezüchtet worden waren, wurden je 2mg der Kulturen in 1 ccm sterilisierten Wassers aufgeschwemmt und die Senkungsgeschwindigkeit der Bakterien wurde in gleicher Weise wie bei Roteblutzellen im Westerngreen'schen Apparat gemessen. Wie Tabelle 2 veranschaulicht, war die Senkungsgeschwindigkeit bei den auf Glukosaminnährboden gezüchteten Stämmen mehr oder weniger verlangsamt, im Vergleich mit den auf gewöhnlichem Nährboden gezüchteten. Aus oben erwähnten Tatsachen kann man vielleicht vermuten, dass die Oberfläche des Bakterienleibes sich auch wahrscheinlich schleimig verändert hat und dadurch die Suspension der Bakterien stabiler geworden ist.

Tabelle 2.

Einfluss des Glukosamins auf die Senkungsgeschwindigkeit der Staphylokokken.

Stämme	Nährboden	Die Bakteriensuspension senkt sich während						
		1 Tag	2 Tage	3 Tage	4 Tage	5 Tage	6 Tage	7 Tage
405	Glukosaminnährboden	2mm	5mm	7mm	9mm	12mm	12mm	14mm
	Gewöhnlicher Nährboden	2	6	9	11	16	17	18
320	Glukosaminnährboden	4	6	12	14	16	18	18
	Gewöhnlicher Nährboden	4.5	7	12	18	23	24	25

Die Senkungsgeschwindigkeit wurde durch die Höhe der oberen klaren Schicht in mm ausgedrückt.

d. Einfluss auf die hämolytische Wirkung der Staphylokokken.

4 Staphylokokkenstämmen, die alle ausgesprochene Hämolyse aufwiesen, wurden in gleicher Weise wie oben auf glukosaminhaltigen und glukosaminfreien Blutagarplatten wiederholt kultiviert und auf ihre hämolytische Wirkung geprüft. Dabei ergab sich, dass bei diesen Versuchen auch fast keine Unterschiede wahrgenommen wurden.

Glukosaminspaltung durch Staphylokokken
und ihre Bedeutung für die Differenzierung der pathogenen Stämme.

Zur einfachen Differenzierung der pathogenen Staphylokokken von non-pathogenen wurden bisher verschiedene Methoden von mehreren Autoren vorgeschlagen, wie z. B. Pigmentbildung auf Löffler'scher Serumplatte, Hämolyse auf Blutagarplatte und Tierversuch an Kaninchen oder Mäusen (Intrakutane oder intravenöse Injektion).

Chapman und seine Mitarbeiter^{8) 9) 10) 11) 12)} behaupteten, dass zur Differenzierung der pathogenen Staphylokokken in vitro ein Parallelversuch auf Pigmentbildung, Hämolyse und Koagulase, d. h. ein sog. P-H-C-Versuch mit verschiedenen Vorteilen zu empfehlen ist. Zur Isolierung und teilweise auch zur Differenzierung der pathogenen Stämme empfahlen sie auch die violette oder orangegelbe Kolonienbildung auf Krystallviolettagar und das Spaltungsvermögen auf Laktose oder Mannit als charakteristische Eigenschaften der pathogenen Staphylokokken. Kürzlich hatten sie wieder den P-H-C-Versuch als die beste Standardmethode bestätigt und kamen zu dem Schluss, dass „the coagulase test is the most reliable single test for the differentiation of pathogenic from non-pathogenic staphylococci.“

Hallman,¹³⁾ Thompson und Khorazo,¹⁴⁾ Cruikshank¹⁵⁾ u. a. hatten auch diesbezüglich verschiedene Untersuchungen ausgeführt.

Hinsichtlich der anderen Literatur über das Problem sei auf die Arbeiten von Chapman und seinen Mitarbeitern¹²⁾ verwiesen. Für denselben Zweck haben die Verfasser sowohl Glukosaminspaltung als auch P-H-C-Versuch vergleichend untersucht und fanden dabei, dass die Glukosaminmethode viel einfacher überzeugende Resultate erbringen kann. (Tabelle 3).

a. Die Glukosaminspaltung und die Pigmentbildung durch Staphylokokken.

(1) 24stündige Agarkulturen der verwendeten Staphylokokkenstämme wurden in fast gleicher Menge in 0,5% Glukosamin-HCl enthaltene Lackmusbouillon übertragen und 24 Stunden lang bei 37°C bebrütet. Daneben kam auch die Lackmusbouillon ohne Zusatz von Glukosamin als Kontrolle zur Verwendung.

In der Kulturflüssigkeit trat bei der Hälfte der benutzten Stämme eine auffallende Farbenumwandlung auf, u. z. unter 24 verwendeten Stämmen spalteten 12 aus Krankheitsherden isolierte Stämme Glukosamin deutlich, indem die Bouillon sich merklich rot oder rotgelblich umwandelte und zugleich eine mehr oder weniger starke Trübung zeigte. Die übrigen 12 Stämme, die teilweise aus Krankheitsherden und teilweise auch aus Luft isoliert waren, zeigten dagegen nur eine leichte Trübung und verursachten keine Veränderung auf violette

Tabelle 3.
Glukosaminspaltung durch Staphylokokken und P-H-C-Versuch.

Stämme	Quelle der Stämme	Pigmentbildung auf Löffler'scher Platte (P)	Plasma-koagulation (C)	Haemolyse auf Blutagarplatte (H)	Glukosaminspaltung (G)
204	Subkutane Phlegmone	Goldgelb	+	##	+
205	Osteomyelitis tibiae	"	+	+	+
259	Panaritium	"	+	+	+
260	Otitis media acuta	"	+	+	+
263	Hüftgelenkeiterung	"	+	##	+
338	Parotitis acuta	"	##	##	+
405	Lymphadenitis purulenta	"	##	+	+
476	Traumatische Gangraen	"	##	+	+
534	Osteomyelitis femoris	"	##	##	+
Hosi	Otitis media acuta	"	##	+	+
297	Osteomyelitis tibiae	Weiss → schwach gelblich	##	+	+
490	Lymphadenitis acuta	Weiss → schwach gelblich	##	—	+
288	Haematurie	Weiss	—	—	—
317	Myositis purulenta	"	—	—	—
319	Subkutaner Abscess d. Montgomery'schen Drüse	"	—	—	—
320	Ohrfurunkel	"	—	—	—
475	Kontusion	"	—	—	—
3	Luftkeim	"	—	—	—
4	"	"	—	—	—
6	"	"	—	+	—
7	"	"	—	+	—
8	"	"	—	—	—
I	"	Citronengelb	—	—	—
II	"	Citronengelb	—	—	—

Bei Plasmakoagulation:

- ## bedeutet, dass ganze Plasma vollständig koaguliert.
- ++ bedeutet, dass es mittelmässig koaguliert.
- + bedeutet, dass es nur teilweise, besonders in unterem Abschnitt koaguliert.
- bedeutet keine Koagulation.

Bei Hämolyse:

- ## bedeutet, dass der Diameter des hämolysierten Hofes 5mm od. darüber beträgt.
- ++ bedeutet, dass der Diameter des hämolysierten Hofes 2~5mm beträgt.
- + bedeutet, dass der Diameter des hämolysierten Hofes der Koloniengrösse entspricht.
- bedeutet, keine Hämolyse,

Lackmusfarbe. In bezug auf Pigmentbildung war es als sicher erwiesen, dass 10 Stämme unter 12, die Glukosamin spalteten, auf der Löffler'schen Platte eine auffallend gelbe Kolonie bildeten. Dies gilt zum Beweis dafür, dass diese von verschiedenen Krankheitsherden herrührenden Stämme alle *Staphylococcus aureus* sind. Bei den übrigen 2 Stämmen waren die Kolonien anfänglich weisslich, zeigten aber erst beim Belassen einiger Tage in Zimmertemperatur einen leichten

gelblichen Ton. Diese Stämme verhielten sich also zuerst scheinbar wie *Staphylococcus albus* doch später wie *Staphylococcus aureus* hinsichtlich der Pigmentbildung. Dagegen 10 unter anderen 12 Stämmen, die Glukosamin nicht spalten konnten, sind in die Kategorie von *Staphylococcus albus* einzuzählen, indem sie auf der Löffler'scher Serumplatte weissliche Kolonien bildeten, die übrigen 2 Stämme sind wegen ihrer hellgrüngelben Kolonienbildung als *Staphylococcus citreus* zu betrachten.

Es wurde ferner der Lackmusbouillon Glukosamin-HCl in Konzentration von 2%, 1%, 0,5%, 0,25%, und 0,1% zugesetzt und sie mit einigen Glukosamin spaltenden Stämmen beimpft. Hierbei ergab sich, dass die Farbenänderung mit erhöhter Konzentration einherging und 0,5% Glukosamin-HCl eine geeignete Konzentration für diesen Versuch darstellte.

(2) 12 Stämme, die in Bouillon Glukosamin spalteten, verhielten sich gegen Glukosamin auf den Lackmusagarplatten genau so gleich wie in Bouillon. Dabei boten alle Lackmusplatten einen leicht rötlichen Farbenton, was auf die Spaltung des Glukosamins hinwies. Diese Farbenänderung war jedoch nicht so deutlich wie in Lackmusbouillon, weshalb zur Diagnose der Pathogenität der Staphylokokken vielmehr die Lackmusbouillon vorzuziehen ist. Bei anderen 12 Stämmen, die in Bouillon Glukosamin nicht spalteten, bestätigte man auch auf der Lackmusagarplatte keinerlei Farbenänderung. Bei der zur Kontrolle gedienten Lackmusplatte trat auch keine Farbenänderung in Erscheinung.

(3) Bei der Stichkultur in Lackmusagarzylinder liess sich auch fast keine besondere Veränderung bemerken. Der Farbstoff blieb immer tief violett sowohl in glukosaminhaltigem als auch in glukosaminfreiem Nährboden.

b. Die Glukosaminspaltung und die Hämolyse durch Staphylokokken.

24stündige Kulturen von allen obengenannten Stämmen wurden in mässiger Verdünnung in Kochsalzlösung aufgeschwemmt und auf die Blutagarplatte (Defibriniertes Kaninchenblut war dem gewöhnlichen Nähragar in Konzentration von 5% zugesetzt) geimpft, und nach 24stündiger Bebrütung bei 37°C wurde die Grösse des hämolytierten Hofes um einige vereinzelte Kolonien genau gemessen, wobei sich ergab, dass alle 10 Stämme von *Staphylococcus aureus*, deren

einige besonders stärkere Hämolyse aufwiesen, mehr oder weniger stark positiv ausfielen, während 10 Stämme von *Staphylococcus albus* und 2 Stämme von *Staphylococcus citreus*, abgesehen von 2 leicht positiv ausgefallenen (Nr. 6 und Nr. 7), sich alle negativ erwiesen. Von den übrigen 2 Stämmen, deren Kolonien auf der Löffler'schen Platte anfangs weisslich, später hellgelb aussahen, war die Hämolyse bei einem Stamm (Nr. 490) negativ, während sie bei dem anderen (Nr. 297) positiv ausfiel. Aus dem oben angestellten Versuche ergab sich am Schluss, dass die Differenzierung durch die Hämolyse mit der durch Glukosaminspaltung wesentlich fast übereinstimmte, abgesehen davon, dass ein Stamm (Nr. 490), welcher Glukosamin spaltete und als eine Übergangsform zwischen *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus albus* anzusehen war, keine Hämolyse aufweis und dass 2 von der Luft isolierten Stämme (Nr. 6 und Nr. 7), die Glukosamin nicht spalten konnten, eine hämolytische Wirkung aufzeigten.

c. Glukosaminspaltung und Plasmakoagulation durch Staphylokokken.

Das gebrauchte Zitratplasma wurde in folgender Weise hergestellt: 1 Teil der 1% Natriumcitratlösung (in 0,9% NaCl-Lösung gelöst) wurde mit 2,5 Teil Kaninchenblut gemischt und zentrifugiert, um eine klare, keimfreie Zitratplasmalösung herzustellen. Die Plasmalösung wurde dann je ca. 2 ccm in sterilisierte Reagenzröhrchen verteilt und mit je 1 mg von 24stündigen Kulturen jedes Staphylokokkenstammes geimpft. Nach 1 bis 5tägiger Bebrütung bei 37°C ergab sich, dass 10 Glukosamin spaltende Stämme, die wegen ihrer pigmentbildenden Eigenschaft als *Staphylococcus aureus* betrachtet wurden, binnen 24-48 Stunden eine mehr oder weniger starke Plasmakoagulation herbeiführten, während 12 Glukosamin nicht spaltende Stämme, die teilweise als *Staphylococcus albus* und teilweise als *Staphylococcus citreus* anzunehmen waren, keine Plasmakoagulation hervorriefen. Die Stämme, Nr. 490 und Nr. 297, die anfänglich weissliche, später aber hellgelbliche Kolonien bildeten und dabei noch Glukosamin deutlich spalteten, führten auch eine ebenso starke Plasmakoagulation wie *Staphylococcus aureus* herbei. Aus den oben erwähnten Resultaten geht hervor, dass 12 unter 24 Stämme eine mehr oder weniger starke Plasmakoagulation hervorrufen und gerade auch diesen Stämmen das Vermögen zur Glukosaminspaltung innewohnt, wie es in Tabelle 3 ersichtlich ist. Soweit der Versuch in Frage kommt, gilt es

als sicher, dass eine vollständige Parallelität zwischen beiden Eigenschaften, Plasmakoagulation und Glukosaminspaltung, besteht.

Was die Differenzierung von pathogenen Staphylokokken anbelangt, so ist eine zweckmässige Methode wegen unbeständiger Variation ihrer biologischen Eigenschaften kaum zu erwarten. Nach Chapman und seinen Mitarbeitern¹²⁾ gingen zuerst die hämolytische Wirkung und später auch die Pigmentbildung bei vielen Stämmen der pathogenen Staphylokokken während ihrer Kultur auf gewöhnlichem Nähragar verloren, d. h. beide Eigenschaften boten keine konstanten Merkmale dar, die für die Differenzierung der pathogenen Staphylokokken dienen. Die Plasmakoagulation erwies sich dagegen als eine konstante, charakteristische Eigenschaft für pathogene Staphylokokken, die ungeachtet langjähriger Kultur sich niemals veränderte und ein höchst zuverlässiges Merkmal darstellte. Den Verfassern gelang es nun 24 verschieden alte Stämme an Hand des Glukosaminspaltungsvermögens in Lackmusbouillon klar und eindeutig in eine pathogene und eine non-pathogene Gruppe einzuteilen. Diese Differenzierung stimmte mit der durch Plasmakoagulation vollkommen überein. Wenn auch die Zahl der benutzten Stämme noch ziemlich gering ist, ist die Methode, glauben die Verfasser, als eine zuverlässige zu empfehlen. Wenn man also zur Differenzierung der Pathogenität der Staphylokokken ausser dem sog. P-H-C-Versuch sich noch der Glukosamin-Methode, also abgekürzt eines P-H-C-G-Versuchs, oder sogar eines C-G-Versuchs (Pigmentbildung und Hämolyse sind wegen ihrer Variabilität ungeeignet) bedient, so wird der diagnostische Wert an Richtigkeit bedeutend zunehmen. In nächster Mitteilung wollen die Verfasser die Tatsache weiter mit zahlreichen Stämmen bestätigen.

Über die Virulenzsteigerung von Staphylokokken durch wiederholte Übertragung auf den glukosaminhaltigen Nährboden.

Ausser der all bekannten Tatsache, dass die Bakterien durch die wiederholten Tierpassagen hochvirulent gemacht werden, ist es selbstverständlich sehr schwer, die Virulenz einer Bakterienart *in vitro*, d. h. durch Kultivierung auf den Nährboden zu steigern und finden sich deshalb nur wenige Beschreibungen darüber.

Viele Autoren (Hach,¹⁶⁾ Quiroga,¹⁷⁾ Murray,¹⁸⁾ Pijoan,¹⁹⁾ Felton²⁰⁾) hatten die Extrakte der verschiedenen Organe (Hirn, Hoden, Niere, Milz, Lunge

etc.) dem Nährboden zugesetzt und konnten die Virulenz verschiedener Bakterienarten (Pneumokokken, Staphylokokken u. Meningokokken) mehr oder weniger steigern. Nungester, Wolf und Jourdonais²¹⁾ hatten Stärkeagar oder Stärkegelatin gebraucht, um die Virulenz der auf diesem Nährboden kultivierten Bakterien durch eine temporäre Hüllebildung zu steigern. Cohen²²⁾ hatte den „Mucin“-nährboden für denselben Zweck empfohlen.

O'Meara und Brown²³⁾ konnten die Virulenz der Pneumokokken durch Kultivierung auf einem Nährboden mit Zusatz von Thioglykolsäure ziemlich hoch steigern. Bei uns berichtete Magara,²⁴⁾ dass die Virulenz der Pneumokokken durch die Kultur in Kaninchen- oder Pferdezeitratblut ebenso hoch wie bei der Passage in Mäuse gesteigert werden konnte.

Nun hatten die Verfasser die Virulenz der auf den glukosaminhaltigen Nährboden gezüchteten Staphylokokken in folgender Weise untersucht.

Unter den zur Verfügung gestellten 24 Staphylokokkenstämmen wurden 3 glukosaminspaltende Stämme, Nr. 405, 204 und 476, und 3 nicht spaltende Stämme, Nr. 288, 320 und I., also insgesamt 6 Stämme sowohl auf Glukosamin-HCl haltiger als auch auf gewöhnlicher Agarplatte 24 Stunden lang bei 37°C kultiviert und diese Kultur wurde 10 mal hintereinander wiederholt. Um die Virulenz der so hergestellten Kultur zu prüfen, wurden beide letztmaligen Kulturen mässig in Kochsalzlösung aufgeschwemmt und in verschiedener Menge in Mäuse intraperitoneal eingespritzt. Beim Tod der Mäuse wurden die Bakterien aus dem Herzblut des eingegangenen Tieres gezüchtet und nur bei positiven Kulturen wurde die Todesursache als Bakterieninfektion bestätigt. Wie aus Tabelle 4 ersichtlich, war die Virulenz der Staphylokokken durch Passiren auf Glukosamin-nährboden 3-10 mal so hoch gesteigert, z. B. die D. L. M. betrug bei einem den Glukosamin-nährboden durchgemachten Stamm (Nr. 405) 0,3 mg, hingegen bei demselben Stamm, den gewöhnlichen Nährboden durchpassierend, 1 mg, also die Virulenz des ersteren fand sich 3 fach so hoch gesteigert wie die des letzteren. Bei Stamm Nr. 320 betrug D.L.M. bei Passage auf Glukosamin-nährboden 0,5-0,2 mg, dagegen bei Züchtung auf gewöhnlichem Nährboden 2 mg, also die Virulenz war etwa 4-10 mal so hoch gesteigert. Beim Stamm Nr. 476 wurde die Virulenz in ganz gleicher Weise von 2 mg auf 0,5 mg, beim Stamm Nr. 288 von 0,5 mg auf 0,1 mg, beim Stamm Nr. 204 von 0,5 mg auf 0,1 mg, und beim Stamm Nr. I von 5 mg auf 1 mg, also in jedem Falle 4-5 mal hoch gesteigert. Die Virulenz der Staphylokokken kann also durch 10 malige Umzüchtung auf glukosaminhaltigen Nährboden etwa 3 bis 5, ja sogar gelegentlich 10 mal so hoch verstärkt werden.

Tabelle 4.

Virulenzsteigerung von Staphylokokken auf Glukosaminnährboden.

Stämme	Staphylococcus aureus						Staphylococcus albus		St. citreus			
Nr.	405		204		476		320		288		I	
Injizierte Menge	Gl.-N.B.	Kontrolle	Gl.-N.B.	Kontrolle	Gl.-N.B.	Kontrolle	Gl.-N.B.	Kontrolle	Gl.-N.B.	Kontrolle	Gl.-N.B.	Kontrolle
5 mg		$\frac{3}{3}$				$\frac{3}{3}$	$\frac{1}{1}$	$\frac{1}{1}$				$\frac{3}{3}$
3 mg		$\frac{3}{3}$				$\frac{3}{3}$	$\frac{1}{1}$	$\frac{3}{3}$				$\frac{3}{3}$
2 mg	$\frac{3}{3}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{1}{1}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{1}{1}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{1}{1}$	$\frac{1}{1}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{1}{3}$
1 mg	$\frac{3}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{3}{1}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{3}{1}$	$\frac{3}{1}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{0}{1}$
0,5 mg	$\frac{3}{3}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{0}{1}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{2}{3}$	$\frac{0}{1}$
0,3 mg	$\frac{3}{3}$											
0,2 mg			$\frac{3}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{2}{3}$	$\frac{0}{3}$	
0,1 mg	$\frac{1}{3}$		$\frac{3}{3}$		$\frac{0}{3}$	$\frac{3}{3}$	$\frac{1}{3}$		$\frac{3}{3}$	$\frac{1}{3}$		
0,05 mg			$\frac{1}{3}$					$\frac{1}{3}$				
D.L.M.	mg 0,3	mg 1,0	mg 0,1	mg 0,5	mg 0,5	mg 2,0	mg 0,5~ 2 0,2	mg 2	mg 0,1	mg 0,5	mg 1,0	mg 5,0
Virulenzsteigerung	3 fach		5 fach		4 fach		4~10 fach		5 fach		5 fach	

$\frac{3}{3}$ bedeutet, dass unter 3 gebrauchten Tieren alle 3 gestorben sind, u. desgl. Gl.-N.B. bedeutet Glukosaminnährboden.

Zusammenfassung.

(1) Die Staphylokokken sind durch Umzüchtung auf Glukosaminnährboden (0,5%) morphologisch nicht beeinflusst. Die Kolonie wird aber in ihrer Schleimigkeit ziemlich hochgradig gesteigert. Das Wachstum der Staphylokokken wurde auch durch Zusatz von Glukosamin in Nährboden mehr oder weniger befördert.

(2) Glukosamin übt auf die hämolytische Wirkung keinen Einfluss aus, aber die Bakteriensenkungsgeschwindigkeit wird dadurch ziemlich verzögert.

(3) Es gibt zwei Arten von Staphylokokken, deren eine das Glukosamin merklich spaltet und die andere keine Spaltung hervorruft. Diese Eigenschaft stimmt vollkommen mit der der Plasmakoagulation überein, d. h. der Glukosamin spaltende Stamm koaguliert das Plasma, während der Glukosamin nicht spaltende es nicht koaguliert. Wenn also die Plasmakoagulation eine zuverlässige Methode für die Differenzierung der pathogenen Staphylokokken liefert, so wird die Glukosaminspaltung auch in gleichem Sinne bedeutungsvoll sein. Das Glukosamin spaltende Vermögen der Staphylokokken geht nicht

so vollkommen parallel mit den hämolytischen oder pigmentbildenden Eigenschaften.

(4) Die Virulenz der Staphylokokken kann durch mehrmalige Umzüchtung auf glukosaminhaltigen Nährboden etwa 3 bis 5, sogar gelegentlich 10 fach so hoch gesteigert werden.

Literatur.

- (1) Abderhalden, E. u. Fodor, A., Zeitschr. f. physiol. Chem., 1913, **87**, 214.
- (2) Meyer, K., Biochem. Zeitschr., 1913, **57**, 297.
- (3) Meyer, K., Biochem. Zeitschr., 1914, **58**, 415.
- (4) Noble, W. C. and Knacke, F. E. D., J. Bact., 1928, **15**, 55.
- (5) Takao, K., Zeitschr. f. physiol. Chem., 1923, **131**, 307.
- (6) Imaizumi, M., J. Biochem., 1937, **26**, 197.
- (7) Suhara, T., Kyōto Kagaku Kenkyūsyō Kōensyū, 1935, **5**, 135.
- (8) Chapman, G. H., Berens, C., Peters, A. u. Curcio, L., J. Bact., 1934, **28**, 343.
- (9) Chapman, G. H. u. Berens, C., J. Bact., 1935, **29**, 437.
- (10) Chapman, G. H., J. Bact., 1936, **32**, 199.
- (11) Chapman, G. H., Lieb, C. W., Berens, C. u. Curcio, L., J. Bact., 1937, **33**, 533.
- (12) Chapman, G. H., Berens, C., Nilson, E. L. u. Curcio, L., J. Bact., 1938, **35**, 311.
- (13) Hallman, F. A., Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 1937, **36**, 789.
- (14) Thompson, R. u. Khorazo, D., J. Bact., 1937, **34**, 69.
- (15) Cruikshank, R., J. Path. a. Bact., 1937, **45**, 295.
- (16) Hach, I., Zentralb. f. Bakt., I. Orig., 1927, **162**, 127.
- (17) Quiroga, R., C. r. Soc. Biol., 1928, **99**, 1517.
- (18) Murray, E. G. D., Med. Res. Council, Special report series, 1929, **124**, 56.
- (19) Pijoan, M., J. Exp. Med., 1931, **53**, 37.
- (20) Felton, L. D., J. Exp. Med., 1932, **56**, 13.
- (21) Nungester, W. T., Wolf, A. A. und Jourdonais, L. F., Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1932, **30**, 120.
- (22) Cohen, S. M., J. Immun., 1936, **30**, 203.
- (23) O'Meara, R. A. Q. u. Brown, A. M., J. Path. and Bact., 1936, **42**, 679.
- (24) Magara, M., Zikken Igaku Zassi, 1931, **14**, 474.