

BULLETIN INTERNATIONAL  
DE L'ACADÉMIE DES SCIENCES DE CRACOVIE.

CLASSE DES SCIENCES MATHÉMATIQUES ET NATURELLES.

N° 1.

Janvier

1905.

- Sommaire:** 1. M. LEON TOCHTERMANN. De l'action du chlorure de thionyle sur la thiobenzamide.  
2. M. STANISLAS NIEMCZYCKI. Contribution à l'étude des synthèses effectuées au moyen du chlorure de zinc.  
3. M. K. PANEK. Étude bactériologique et chimique du „barszcz“, produit de la fermentation de la betterave rouge.  
4. Mme K. KRAHELSKA. Sur le développement mérogonique des oeufs du *Psammecinus*.  
5. MM. ANNA DRZEWINA et AUG. PETTIT. Sur des hyperplasies tissulaires consécutives à l'ablation de la rate chez les Ichthyopsidés.

Séance du lundi 9 Janvier 1905.

PRÉSIDENCE DE M. N. CYBULSKI.

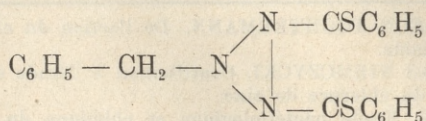
1. M. LEON TOCHTERMANN. O działaniu chlorku tionylu na tiobenzamid. (*Über die Einwirkung von Thionylchlorid auf Thiobenzamid*). (*De l'action du chlorure de thionyle sur la thiobenzamide*). Mémoire présenté par M. L. Marchlewski m. t. à la séance du 6 Décembre 1904.

Bei der Einwirkung von Thionylchlorid auf verschiedene Amine erhielt Michaelis und seine Schüler eine Reihe von Körpern, die sie Thionylamine nannten und in denen das Radikal SO an die Stelle der Aminwasserstoffe eingetreten ist. Bei der Einwirkung von  $\text{SOCl}_2$  auf Thiobenzamid verläuft die Reaktion ganz anders, indem sich gleichzeitig mehrere Körper bilden, deren Trennung und Reinigung durch Ausziehen des Reaktionsgemisches mit Benzol und fraktionierte Kristallisation gelang. Der eine von ihnen, ein roter Körper vom Schm.  $117^\circ\text{C}$  löst sich in allen organischen Lösungsmitteln, enthält, wie man es aus der Einwirkung Phenylhydrazin auf denselben ersieht, eine Keto- oder Aldehydgruppe und liefert bei der Einwirkung von Silberoxyd einen Körper, der bei  $146^\circ\text{—}147^\circ\text{C}$  schmilzt und sich als Dibenzamid erwies. Aus seinem Verhalten und den Analysen ergibt sich seine Zusammensetzung und sein Bau:





Es ist als Benzothiobenzamid aufzufassen. Der zweite Körper, der in langen weißen Nadeln kristallisiert und bei 88—90° C schmilzt, ist sehr indifferent, läßt sich nicht in Komponenten zersetzen, aus denen man auf seinen Bau einen Schluß ziehen könnte. Aus den Analysen und dem Verlauf der Reaktion ist man doch einigermaßen berechtigt (zwar ohne Beweise) ihm die Formel



zuzuschreiben. Er löst sich in allen organischen Lösungsmitteln und ergibt bei der Oxydation einen Körper von noch mehr verwickelter Natur. Der dritte Körper schließlich ließ sich infolge sehr schlechter Ausbeute nicht in reinem Zustande erhalten.

2. M. STANISLAS NIEMCZYCKI. *Przyczynek do syntez zapomocą chlorku cynkowego. (Ein Beitrag zu den Synthesen mittels Zinkchlorid). (Contribution à l'étude des synthèses effectuées au moyen du chlorure de zinc). Mémoire présenté par M. Br. Radziszewski m. t. à la séance du 6 Déc. 1904.*

Es ist bereits bewiesen, daß die Alkoholradikale bei den Synthesen mittels Zinkchlorids eine molekulare Umsetzung in demselben Sinne erleiden, wie es bei den Synthesen der aromatischen Kohlenwasserstoffe mittels Aluminiumchlorids und Eisenchlorids der Fall ist. Es wurde nämlich von Seńkowski<sup>1)</sup> festgestellt, daß das von Liebmann<sup>2)</sup> durch Erhitzen von Phenol mit Isobutylalkohol und Chlorzink erhaltene Isobutylphenol identisch ist mit dem p. tertiären Butylphenol  $(\text{CH}_3)_3 \cdot \text{C} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{OH}$  [Dimetho-äthylphenol (4)]. Aller Wahrscheinlichkeit nach ist das von Goldschmidt<sup>3)</sup> durch Erhitzen von Benzol mit Isobutylalkohol und Chlorzink erhaltene Isobutylbenzol tertiäres Butylbenzol<sup>4)</sup>. Unter diesen Umständen wird demnach das Radikal

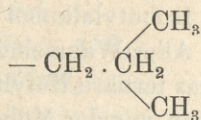
<sup>1)</sup> B. d. d. ch. G. XXIV. 2974.

<sup>2)</sup> Ibidem XIV. 1842. XV. 150.

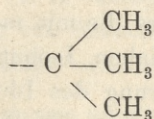
<sup>3)</sup> B. d. d. ch. G. XV. 1066.

<sup>4)</sup> Seńkowski: l. c. 2975.



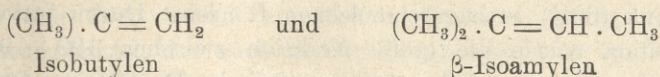


in das tertiäre Radikal



umgelagert.

Später haben R. Anschütz und H. Beckerhoff<sup>1)</sup> nachgewiesen, daß unter analogen Umständen auch das Isoamylradikal  $(\text{CH}_3)_2 \cdot \text{CH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_3$  in das Tertiäramylradikal  $(\text{CH}_3)_2 \text{C} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_3$  übergeht, indem sie sich überzeugten daß das nach der Liebmannschen Reaktion erhaltene Amylphenol mit B. Fischers und B. Grütznerns Tertiäramylphenol (1', 1' — Dimethopropylphenol) identisch ist. Dabei haben Anschütz und Beckerhoff den Gedanken ausgesprochen, daß bei der Einwirkung von Chlorzink auf Phenol und Isobutyl- respekt. Isoamylalkohol zunächst die Kohlenwasserstoffe



entstehen, die sich unter dem Einflusse der Kondensationsmittel an das p. Kohlenstoffatom des Phenols anlagern, dessen Wasserstoff an den Fettrest wandert.

Die molekulare Umlagerung der Alkoholradikale in dem oben erörterten Sinne ist außer bei der Reaktion von Liebmann und Goldschmidt auch bei der Methode von Studer beobachtet worden, nach welcher die homologen Aniline durch Erhitzen des Anilinchlorhydrats mit entsprechenden Alkoholen oder durch Einwirkung von Chlorzink auf Anilin und entsprechende Alkohole erhalten werden. In allen bis jetzt beobachteten Fällen entstehen p. Verbindungen<sup>2)</sup>.

Gelegentlich meiner Untersuchungen über normale Butyltoluole wurde meine Aufmerksamkeit auf das von Goldschmidt durch

<sup>1)</sup> B. d. d. ch. G. XXVIII. 407.

<sup>2)</sup> Seńkowski: B. d. d. ch. G. XXIV. 2974.



Erhitzen von Toluol mit Isobutylalkohol und Chlorzink <sup>1)</sup> erhaltene Isobutyltoluol gelenkt. Aller Wahrscheinlichkeit nach sollte man in dem Kohlenwasserstoff das tertiäre Butyltoluol erwarten. Die Entscheidung dieser Frage schien mir der Mühe wert zu sein, da uns bis jetzt direkte Beweise des Einflusses von Chlorzink auf die Kohlenwasserstoffsynthese, besonders die mit mehreren Seitenketten fehlen. Das Nitroderivat des fraglichen Isobutyltoluols erschien mir als besonders geeignet zur Führung des Identitätsbeweises, indem sich mit Hilfe desselben im günstigen Falle sowohl auf die Struktur des Butylradikales, sowie auf die gegenseitige Stellung der Seitenketten schließen läßt. Nach den Untersuchungen M. Białobrzeskis <sup>2)</sup> läßt sich p. Tertiärbutyltoluol höchstens in Dinitroderivat überführen, während das m. Tertiärbutyltoluol (1. 3. Methyl-dimethoethylphen) unter denselben Umständen mit großer Leichtigkeit drei Nitrogruppen bindet und das 2. 4. 6. Trinitro- $\psi$ -butyltoluol  $C_4H_9 \cdot C_6H(NO_2)_3 \cdot CH_3$  „künstlichen Moschus“ gibt, das bei 96—97° schmilzt; Dinitrotertiär- p.-butyltoluol schmilzt bei 95°.

Das in Rede stehende Isobutyltoluol wurde erhalten nach der Methode von Goldschmidt durch Erhitzen gleicher Teile von Toluol (15 g) und Isobutylalkohol (15 g) mit frischgeschmolzenem Chlorzink (60 g) in zugeschmolzenen Röhren. Durch fraktionierte Destillation wurde die größte Fraktion zwischen 190—195° ausgeschieden, aus der wieder durch mehrfache Destillation das eigentliche Produkt zwischen 191—193° erhalten wurde. Dieses mit dem fünffachen Gewichte des Gemisches von Salpetersäure und Schwefelsäure (1 Teil Salpetersäure 1·52 auf zwei Teile rauchender Schwefelsäure) eine Stunde lang auf dem Wasserbade erhitzt, gab ein öliges Nitroprodukt, das schon einen starken Moschusgeruch verriet und erst nach längerem Stehen kristallinisch erstarrte. Nach zweifachem Umkristallisieren aus Ligroin wurde das reine Produkt in schön ausgebildeten schwachgelben Nadeln von starkem Moschusgeruch, die bei 97—97° schmelzen, erhalten. Die Vermutung, daß das 2. 4. 6. Trinitro- $\psi$ -butyltoluol vorliegt, wurde durch die Stickstoffbestimmung bestätigt.

0·1040 g Substanz gaben 14·42 cm<sup>3</sup> Stickstoff bei 21·7° und 739·8 mm.

<sup>1)</sup> B. d. d. ch. G. 15. 1067.

<sup>2)</sup> Ibidem XXX. 1773.



Die Formel	erhalten
$C_4 H_9 \cdot C_6 H (NO_2)_3 \cdot CH_3$	
verlangt N. 14·90%	15·29%

Demnach ist Goldschmidts Isobutyltoluol identisch mit dem m. Pseudobutyltoluol (1. 3. Methyl-dimethoxyäthylphen), das von Baur<sup>1)</sup> durch Einwirkung von Aluminiumchlorid auf ein Gemenge von Toluol und Isobutylalkohol erhalten wurde.

Aus dem chemischen Laboratorium der Universität in Lemberg.

3. M. K. PANEK. *Mikroby oraz chemizm kiśnienia barszczu. (Bakteriologische und chemische Studien über die „Barszcz“ genannte Gährung der roten Rüben). (Etude bactériologique et chimique du „barszcz“ produit de la fermentation de la betterave rouge).* Mémoire présenté par M. J. Rostański m. t.

(Planche I).

Die in polnischen Ländern vielfach genossene, „Barszcz“, „Barschtsch“<sup>2)</sup> genannte Aufgußsuppe, welche durch Gährung der roten Rüben erhalten wird, ist bisher nur wenig untersucht worden; und doch ist sie ein weit verbreitetes, häufig genossenes Nahrungsmittel, das auch in der Krankendiät eine große Rolle spielt. Eine nähere Untersuchung der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung, sowie des Charakters und des Verlaufes dieser Gährung erscheint daher in mancher Beziehung wünschenswert. Andererseits ist kein Mangel an Arbeiten über Nahrungsmittel aus dem Pflanzenreiche, die wie Sauerkraut und Gurken auf dem Wege der Gährung zubereitet werden. Daß gerade über die Gährung der roten Rüben so wenig bekannt ist, dürfte daher nicht daran liegen, daß diese Art der Gährung weniger wissenschaftliches Interesse erweckte, als vielmehr daran, daß der „Barszcz“ außerhalb der genannten Gegenden nur wenig bekannt ist.

Deshalb erscheint es angebracht, hier eine kurze Beschreibung seiner Zubereitung zu geben. Recht süße rote Rüben werden zunächst sorgfältig gereinigt, dann geschält und in dünne Scheiben

<sup>1)</sup> B. d. d. ch. G. XIX. 1724.

<sup>2)</sup> Den polnischen Namen „Barszcz“ (Barschtsch) leitet Rostański von dem deutschen Worte „barsch“ gleich „herb“ ab. Rostański.



geschnitten. Darauf gibt man sie in ein irdenes Gefäß, wo sie mit weichem Wasser soweit übergossen werden, daß es sie ganz bedeckt und etwa 2—3 Finger hoch darüber steht. Das mit einem Leintuche bedeckte Gefäß wird an einem warmen Orte aufgestellt, während des Sommers bei Zimmertemperatur, im Winter nahe dem Ofen. Nach 3—4 Tagen ist bei nicht zu großer Wärme die Gärung in vollem Gange und nach 6—7 Tagen ist der Barszcz fertig. Nun wird er zum Gebrauch durch ein leinenes Tuch abgeseiht (um ihn von der Pilzdecke und den Rübenscheiben zu trennen), oder auch man stellt ihn einfach an einen kühlen Ort z. B. in den Keller. Der auf diese Weise erhaltene Barszcz ist eine ziemlich viscose manchmal fadenziehende Flüssigkeit von himbeerroter Farbe, von aromatischem Geruch und angenehm süß-säuerlichem Geschmack. Als Aufguß reizt er den Appetit und dient unter Zusatz von verschiedenen Beigaben, wie Sahne, Fleischbrühe, Mehl, Gemüse etc. als Grundlage mancherlei nahrhaften und wohlschmeckenden Suppen, die alle mit dem gemeinsamen Namen „Barszcz“ belegt werden.

Bei dieser Gärung erhält man jedoch nicht immer ein Produkt von gleicher Güte. Ein richtiger Barszcz soll viscos sein, oder, wie die Hausfrauen sich ausdrücken, „er soll sich ziehen“; denn nur ein solcher besitzt den erwünschten süß-weinsäuerlichen Geschmack. Ein dünflüssiger Aufguß gilt als minderwertig, da sein Geschmack schärfer, herb-sauer ist. Ein solcher Barszcz entsteht z. B., wenn die Rüben bei höherer Temperatur z. B. auf dem Ofen vergähren, wie man das manchmal zur Beschleunigung des Prozesses tut.

Diese Fermentation wurde bislang allgemein als eine Milchsäure-Gärung aufgefaßt, eine irrthümliche Ansicht, die die einzige über diesen Gegenstand handelnde Arbeit von St. Epstein aus dem Prager hygien. Institut des Prof. Hüppe zu beweisen sucht<sup>1)</sup>. Der Verfasser der zitierten Schrift kommt auf Grund seiner Untersuchung zu folgenden Resultaten: Die chemische Untersuchung einer Barszcz-Probe nach 8-tägiger Gärung ergab eine Gesamtsäure von 0.612% auf Milchsäure bezogen. Davon bestanden 7% aus flüchtigen Fettsäuren. hauptsächlich Essigsäure; Buttersäure konnte nicht nachgewiesen werden, hingegen fanden sich Spuren von Ameisensäure. Von nichtflüchtigen Säuren isolierte er Milchsäure.

<sup>1)</sup> Epstein. Untersuchung über die Borscht oder Barszcz genannte Gärung der roten Rüben. Archiv für Hygiene 36 S. 145.



Die bakteriologische Untersuchung verschiedener Proben, die der Reihe nach an den einzelnen Gärungstagen entnommen waren, zeigten anfangs die Entwicklung der verschiedenartigsten Mikroorganismen. sowohl solcher, die Gelatine auflösen. aus der Gruppe der Heubazillen, sowie andere Arten, die weder Gelatine auflösen noch Säure bilden. Nach 3 Tagen jedoch fand der Autor eine lebhaftere Entwicklung von Säurebildnern, die nach 7 Tagen ausschließlich das Feld behaupteten.

Unter den Mikroorganismen züchtete der Autor aus 3 untersuchten Proben 3 verschiedene Arten von Stäbchen, die er mit *x*, *y*, *z* bezeichnet, leider ohne eine genauere Beschreibung zu geben. Jeder dieser Mikroorganismen, auf sterilem Rübenextrakt geimpft, erzeugte, wie der Autor angibt, den gleichen Gärungsprozeß, wie im eigentlichen Barszcz. In 8 Tagen erreichte die Gesamtsäure ihren Höhepunkt, wobei hauptsächlich Essigsäure und Milchsäure entstanden. Die gärende Flüssigkeit besaß einen angenehmen Geschmack und Geruch. Schließlich gelangt der Autor auf Grund der Untersuchung jener 3 Barszcz-Proben zu dem Schlusse, daß die rote Rüben-Gärung durch verschiedene säurebildende Mikroorganismen hervorgerufen werden könne.

Schon hier möchte ich hervorheben, daß die Ergebnisse meiner Untersuchung im Prinzip von denen Epsteins abweichen.

Bevor ich zur Beschreibung der Untersuchung der eigentlichen Sauerbrühe übergehe, empfiehlt es sich, die Zusammensetzung der roten Rüben selbst zu betrachten, mit besonderer Berücksichtigung der wasserlöslichen Bestandteile, welche später die Nährlösung für die in Betracht kommenden Mikroorganismen darstellen. Aus den vorliegenden ungemein zahlreichen Analysen der roten Rüben ist vor allem ersichtlich, daß ihre Zusammensetzung ziemlich weiten Schwankungen unterliegt und in erster Linie von der Art der roten Rüben und den Züchtungsbedingungen abhängt.

Zur Barszcz-Bereitung wird hauptsächlich die süße rote Rube verwendet. Die unlöslichen Bestandteile, wie Zellulose, Arabinsäure u. a., kommen fast gar nicht in Betracht, da ihre Rolle bei der Gärung eine untergeordnete ist, während die Hauptbedeutung den löslichen Bestandteilen zukommt. Zu diesen gehören vor allem stickstoffhaltige Körper und Zuckerarten. Der Gehalt an Stickstoffsubstanz (auf Eiweiß berechnet) der roten Rube beträgt ungefähr 1%, die Zuckermenge schwankt zwischen 3—7%, beträgt manchmal



sogar mehr, je nach der verwendeten Rübenart. Von Zuckerarten finden sich Rohrzucker, Invertzucker und Raffinose; von anderen Kohlenhydraten werden Pektinkörper und Dextran erwähnt. Diese letztere Substanz soll sich in jungen Rüben finden. Im ausgepreßten Saft der süßen roten Rüben, sowie in wässrigen Auszügen konnte ich sie nicht nachweisen trotz mehrfacher darauf gerichteter Untersuchung. Von stickstoffhaltigen Körpern finden sich außer Eiweißsubstanzen noch kristallinische Verbindungen, wie Asparagin, Glutamin, Betain, außerdem wurden neuerdings noch Leucin und wahrscheinlich noch andere Aminverbindungen, sowie auch Ammoniumsalze nachgewiesen.

Von stickstofffreien Körpern kommen außer den Kohlenhydraten in Betracht: der Gerbstoff, geringe Mengen organischer Säuren, wie Zitronen-, Apfel- und Oxalsäure, und schließlich der den roten Rüben eigentümliche leicht wasserlösliche rote Farbstoff, der unter der Einwirkung von Alkalien anfangs in Dunkelviolettt später in Braun übergeht. Die Asche besteht aus Chloriden, Sulfaten und Phosphaten von Kalium, Natrium, Calcium und Magnesium, außerdem aus geringen Mengen von Kieselsäure und Eisen.

Das quantitative Verhältnis der einzelnen Bestandteile stellt sich auf Grund der durchschnittlichen Analysenzahlen, die ich den König'schen Tafeln entnehme, folgendermaßen dar:

100 gr. frischer Substanz enthalten:				
Wasser	stickstoffhaltige Körper	Fett		
88·00	1·27	0·13		
stickstofffreie Extraktiv-Körper	Zucker	Zellulose	Asche	
8·63	7·5	0·89	1·04	

Die angegebenen Bestandteile finden wir nach Maßgabe ihrer Löslichkeit in mehr oder minder großer Menge auch in dem wässrigen Auszuge bei der Barszcz-Gährung. Den entscheidenden Faktor für den Verlauf derselben wird augenscheinlich der Zucker-gehalt abgeben.

Um einen Überblick über den Gehalt des roten Rübenauszuges vor der Gährung zu haben, machte ich einige Analysen von wässrigen Auszügen, die ich unter Einhaltung der bei der Barszcz-Bereitung obwaltenden Bedingungen bereitete. Zu diesem Zwecke wurde eine abgewogene Menge fein zerriebener roter Rüben in noch frischem Zustande einige Male mit kleinen Mengen Wasser kalt ausgelaugt. Der fast farblose Rübenbrei wurde auf einem



Büchnerschen Filter abfiltriert und nach sorgfältigem Auswaschen tüchtig ausgepreßt. Die einzelnen Auszüge wurden zusammengessen und durch Wasserzusatz auf ein abgemessenes Volumen gebracht.

Die so erhaltene stark gefärbte, jedoch klar durchsichtige Lösung wurde der Analyse unterworfen. Die Zusammensetzung der Auszüge von zwei verschiedenen Rübensorten war folgende:

Der wässrige Auszug von 100 gr. enthielt:

	I	II
Trockenrückstand	8·948 gr.	10·883 gr.
Asche	0·468	0·609
Gesamt-N	0·1209	0·134
Stickstoffhaltige Bestandteile <sup>1)</sup>	0·7560	0·834
Stickstofffreie	7·724	9·440
Rohrzucker	5·677	7·962
Invertzucker (als Dextrose bestimmt)	0·182	0·252 <sup>2)</sup>

Der Zuckergehalt in der Gährungsflüssigkeit ist also recht bedeutend. Die angeführten Bestimmungen wie auch andere ergaben im Rübenauszug stets einen Zuckergehalt von 5—8%.

#### Bakteriologische Untersuchung.

Zur Isolierung der gährungsregenden Mikroorganismen benutzte ich Proben eines 7-tägigen ausgegohrenen „Barszcz“. Derselbe war im Laboratorium unter genauer Einhaltung der üblichen Zubereitungsregeln hergestellt: 2—3 Kg. gereinigte süße rote Rüben wurden in dünne Scheiben geschnitten, in ein entsprechendes Gefäß getan, mit ausgekochtem und auf 27—28° C wieder abgekühltem Wasser in dopelter Menge (dem Gewichte der verwendeten Rüben entsprechend) übergossen und bei Zimmertemperatur von 18—20° C nach Bedeckung mit einem Leintuche aufgestellt. Nach 7 Tagen wurden Untersuchungsproben entnommen. Während dieses Zeitraumes nahm die die Rüben bedeckende Flüssigkeit eine stärker rote Farbe an, die schließlich in einen dunkelhimbeerroten Ton überging. Die anfangs klare Flüssigkeit trübte sich allmählich, wobei ihre Oberfläche sich mit einem weißen Pilzrasen bedeckte. Bei genauem Zusehen zeigte sich, daß die anfängliche Konsistenz

<sup>1)</sup> Auf Eiweiß berechnet.

<sup>2)</sup> Die Zuckerbestimmungen wurden nach Allihn ausgeführt.



der Flüssigkeit sich veränderte. Anfangs dünn und wässrig, wurde sie dickflüssiger und schleimig fadenziehend. Schon diese Tatsache erweckte den Verdacht, daß wir es in diesem Falle mit der sog. schleimigen Gärung zu tun haben. Die Reaktion der Flüssigkeit war stark sauer, der Geruch angenehm aromatisch.

Die mikroskopische Untersuchung von gefärbten Präparaten sowie von frischen, im hängendem Tropfen, zeigte nach 7-tägiger Gärung: *a)* Die Gegenwart von in reichlicher Menge vorhandenen kurzen, stellenweise auch längeren Stäbchenformen, zu zwei oder mehreren in kurze oder längere Ketten aneinander gereiht. Die Enden der Stäbchen waren abgerundet oder verdünnt, die längeren Formen zeigten häufig in der Mitte eine sich schwächer färbende Stelle, ähnlich wie bei der Sporenbildung. *b)* Hefezellen in sehr geringer Menge. *c)* Dicke, charakteristische Fäden von *Oidium lactis*, ebenfalls in geringer Anzahl.

Was die unter *c)* angeführten, kettenförmig gelagerten, zahlreichen Mikroorganismen betrifft, so konnte es auf den ersten Blick den Anschein haben, als handelte es sich um zwei verschiedene Formen: einerseits um sehr kurze, fast kokkenartige, andererseits um längere stäbchenförmige. Die nähere Untersuchung wies jedoch die Einheit der beiden Typen nach; denn die einzelnen Ketten zeigten stellenweise in ihren Gliedern gleichzeitig körnige Formen, sowie auch längere typische Stäbchen. Im ganzen erinnerte das Bild an die Formen des Güntherschen Milchbakteriums. Zur Reinzüchtung der fraglichen Mikroorganismen wurden Barszcz-Proben nach vorausgegangener Verdünnung 1:2000—1:5000 mit sterilem Rübenauszug auf eine Reihe von Gelatinplatten ausgesät. Dabei bediente ich mich folgender Nährböden: *a)* gewöhnliche neutrale Gelatine, *b)* 2% Traubenzucker-Gelatine, *c)* dieselbe mit Zusatz von Calciumkarbonat: *d)* Rübensaftgelatine, *e)* dieselbe mit  $\text{CaCO}_3$ .

Die Rübensaftgelatine stellte ich auf folgende Weise her: Zu Brei verriebene rote Rüben wurden mit der doppelten Gewichtsmenge von abgekochtem Leitungswasser übergossen und 2—3 Stunden unter öfterem Umschütteln darin belassen; der Auszug wurde darauf durch grobes Leintuch filtriert, der Rückstand ausgepreßt und das Filtrat im Dampftopf eine Stunde lang erhitzt. Währenddessen ging die dunkelrote Farbe des Auszuges in schmutzig Grün über, wobei eine geringe Menge schmierigen Bodensatzes ausfiel. Dieser Auszug diente zur Darstellung der Rübengelatine,



sowie zur Verdünnung der Barszcz-Proben bei der Aussaat. Ein L. mit 10% Gelatine versetzten Auszuges wurde nach Klärung mit Eiweiß ohne Alkalisierung noch heiß filtriert. Die auf diese Weise hergestellte Gelatine war vollständig durchsichtig, von grünlich gelber Farbe und von schwach saurer Reaktion. Schon 3—4 Tage nach der Aussaat der Proben auf die genannten Nährböden konnte man eine reichliche Entwicklung von Mikroorganismen erkennen, besonders auf der Rübengelatine. Die Kolonien waren von sehr einheitlicher Beschaffenheit, nur hie und da ließen sich solche von abweichendem Typus erkennen. Die mit gewöhnlicher und zuckerhaltiger Gelatine beschickten Platten waren mit winzigen Kolonien von der Größe eines Stecknadelkopfes, die sich etwas über die Oberfläche wölbten, besät. Auf den mit  $\text{CaCO}_3$  bereiteten Nährböden fanden sich die Kolonien von einem breiten Hofe von aufgehellter Gelatine umgeben, infolge der Lösung des Calciumkarbonats. Ein außerordentlich charakteristisches Aussehen besaßen die auf der Rübengelatine gewachsenen Kolonien. Schon nach 2 Tagen bei 18—20° C bedeckten sich die Platten mit zahlreichen Kolonien in Gestalt von runden, hellen, deutlich über die Oberfläche erhabenen, schleimigen Tropfen. In den folgenden Tagen dehnte sich der Durchmesser dieser Kolonien bedeutend aus und erreichte  $\frac{1}{2}$  bis sogar 1 cm. Einige Kolonien nahmen jedoch eine unregelmäßige Gestalt an, indem sie mit den benachbarten zusammenflossen. Der Schleimgehalt dieser Kolonien trübte sich allmählich und bei Berührung mit der Platinnadel ließen sich Fäden ausziehen. Unter dem Mikroskop fanden sich in gefärbten, sowie in frischen Präparaten dieser Kolonien jene charakteristischen, kurzen Stäbchen, einzeln oder zu Paaren gelagert, sowie auch in kurzen Ketten. Die Rübengelatineplatten stellten eine fast reine Kultur der oben erwähnten kurzen Stäbchenbakterien dar, während man auf der gewöhnlichen und auf der Zuckergelatine stets auch noch andere Formen fand, wenn auch in verschwindender Menge im Verhältnis zu den winzigen Kolonien des kettenbildenden Stäbchens, das außerdem auch den einzigen Säurebildner auf den Platten darstellte.

Außer den beschriebenen ließen sich, besonders auf den mit gew. oder mit Zuckergelatine bereiteten Platten wenig zahlreiche Kolonien von abweichendem Aussehen beobachten, nämlich die charakteristischen Kolonien von *Oidium lactis*, dessen Vorhandensein auch die spätere Untersuchung bestätigte, ferner erhobene,



glänzend weiße Hefekolonien, Torulaarten, die den Zucker nicht zersetzten, und schließlich einige gelatineauflösende Kolonien. Beim Öffnen der Gelatineplatten wurde ein starker, angenehmer Estergeruch bemerkbar. Derselbe hing ausschließlich, wie die spätere Untersuchung lehrte, von jenen gelatinelösenden Kolonien ab. Unter dem Mikroskop ergab sich die Anwesenheit eines beweglichen, nach Gram nicht färbbaren Stäbchenbazillus, dessen Beschreibung weiter unten folgt.

Zwei weitere neubereitete Barszcz-Proben zeigten bei der Aussaat auf Platten ein vollkommen analoges Resultat. Die kurzen kettenbildenden Stäbchen, die auf Rübensaftgelatine schleimige Kolonien darstellten, ergaben auf den Platten beinahe reine Kulturen, die nur hie und da von Oidium-Kolonien durchsetzt waren.

Der Ausfall dieser Untersuchung stand in schroffem Gegensatz zu den Ergebnissen Epsteins; während dieser Verfasser in 3 verschiedenen Barszcz-Proben 3 verschiedenartige typische Milchsäuregährung erregende Mikroorganismen fand, wiesen die Resultate meiner bakteriologischen, wie der später zu beschreibenden chemischen Untersuchungen, auf eine schleimige Gährung hin, die von nur einer bestimmten Mikroorganismenart hervorgerufen wurde. Wie wäre dieser Widerspruch zu erklären? Obleich es wenig wahrscheinlich erschien, daß die Einheitlichkeit der bakteriologischen Untersuchungsergebnisse in 3 verschiedenen Barszcz-Proben eine zufällige war, entschloß ich mich doch zur Untersuchung einer ganzen Reihe von Barszcz-Proben verschiedenartiger Herkunft, um mich zu überzeugen, ob man unter abweichenden Bedingungen nicht andere Mikroorganismen in der Sauerbrühe antrifft, die der Gährung einen anderen Verlauf gäben. Ich untersuchte daher einerseits eine Reihe von selbstbereiteten Barszcz-Proben, andererseits von außerhalb des Laboratoriums hergestellten, die zum Teil in Läden gekauft, zum Teil von mir bekannten Hausfrauen geliefert worden waren.

Die unten folgende Tafel gewährt einen Überblick über die Zahl der betreffenden Mikroorganismenarten in 20 verschiedenen Barszcz-Proben bei der Aussaat auf Platten, die mit Rübingelatine und gew. Gelatine ohne Zucker beschickt waren. Die angeführten Wärmegrade beziehen sich auf die Temperatur, bei welcher der Barszcz vergährte, soweit sich diese bestimmen ließ. Den kettenbildenden Stäbchenbazillus, der die charakteristischen Schleimkolonien hervorruft und der regelmäßig in weit größerer Menge als



andere Mikroorganismen in der Sauerbrühe zu finden ist, bezeichne ich als *Bacterium betae viscosum* — *prątek barszczowy* — Barszcz-Bakterium oder Bakt. der roten Rübengährung. Die Kolonien von abweichendem Typus der Säurebildner bezeichne ich mit  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  etc.

Nr. der Barszcz-Proben	Menge u. Art d. Kolonien	Gärungstemp. des Barszcz	Bemerkungen
I.	1061 Bact. betae visc. 4 esterbildendes Bact. Nr. I. 2 Hefen 3 Oidium	18° C	eigene Zubereitung
II.	2510 Bact. betae visc. 12 Oidium lact.	20° C	"
III.	2811 Bact. betae visc. 8 Oidium lact.	18° C	"
IV.	1136 Bact. betae visc. 6 esterbildendes Bact. Nr. I. 3 " " " II. 4 Coli ähnliche Bact.	18° C	"
V.	Reinkultur von Bact. betae viscosum.	17° C	"
VI.	1262 Bact. betae visc. 17 Oidium lactis 5 esterbildendes Bact. Nr. II.	?	zu Hause bereitet
VII.	1820 Bact. betae visc. 27 Oidium lactis	Zimmertemp.	
VIII.	2376 Kolonien vom Typus „ $\alpha$ “ 4 <sup>3</sup> Bact. betae visc. 4 Oidium lactis	?	eigene Zubereitung
IX.	2278 Bact. betae visc. 10 Oidium lactis 4 esterbildendes Bact. Nr. II.	?	erworben
X.	2004 Bact. betae visc. 10 Oidium lactis	?	"
XI.	1968 Kolonien vom Typus „ $\beta$ “ 3 Oidium lactis	?	"
XII.	1648 Bact. betae visc. 1312 Kolonien „ $\alpha$ “	?	"
XIII.	2049 Bact. betae visc. 2 Oidium lactis	Zimmertemp.	zu Hause bereitet



Nr. der Barszcz-Probe	Menge u. Art. d. Kolonien	Gärungstemp. der Barszcz	Bemerkungen
XIV.	1325 Kolonien vom Typus „ $\gamma$ “ 27 Bact. betae visc. 6 Oidium lactis	24° C	eigene Zubereitung
XV.	Reinkultur von B. betae visc.	16° C	„
XVI.	2160 Bact. betae visc. 9 Oidium lactis	?	erworben
XVII.	1245 Bact. betae visc. 6 Oidium lactis	18° C	eigene Zubereitung
XVIII.	2049 Bact. betae visc. 2 Oidium lactis	22° C	„
XIX.	Reinkultur von „ $\alpha$ “ Kolonien	28—29° C	„
XX.	2814 Kolonien vom Typus „ $\alpha$ “ 6 Bact. betae visc.	26° C	„

Aus der obigen Zusammenstellung ersehen wir, daß mit Ausnahme der beiden Proben Nr. XI. u. XIX., alle die Anwesenheit des Barszcz-Bacteriums ergeben; in der Mehrzahl der Fälle ist es der einzige säurebildende Mikroorganismus. Nun fragte es sich, ob die Gegenwart von anderen Säurebildnern (die unter  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  in der Tabelle angeführt sind), eine zufällige Erscheinung ist, oder vielmehr von gewissen Bedingungen abhängt. Ein Blick auf die Tabelle ergibt vor allem die interessante Tatsache, daß bei Zimmertemperatur unter 25° C, bei welcher der Barszcz der Regel nach bereitet wird, die Schleimgärung unter dem ausschließlichen Einfluß des Barszcz-Bakteriums erfolgt, während andersartige Mikroorganismen sich hauptsächlich bei höherer Temperatur in der Sauerbrühe entwickeln; denn bei der Gärung in höherer Temperatur als 25° C trifft man das Barszcz-Bakt. entweder gar nicht, oder in verschwindend geringen Mengen im Verhältnis zu anderen Säurebildnern an.

Ferner erschien es notwendig den ganzen Verlauf der Gärung zu studieren, um festzustellen, ob und inwieweit andere Mikroorganismen anfangs an der Rübengärung teilnehmen und später unter dem Einfluß der anwachsenden Säure zu Grunde



gehen, während andere an ihre Stelle treten. Zu diesem Behufe säte ich von Tag zu Tag, wie es Epstein tat, Proben des gährenden Rübenaufgusses auf Platten aus. Dazu benutzte ich außer den schon beschriebenen Nährböden noch mit gährendem Barszcz hergestellte Gelatine, die jedesmal vor dem Aufgießen auf die Platten frisch bereitet wurde durch Entnahme einer entsprechenden Menge Sauerbrühe, Mischung mit Gelatine und nachfolgende Sterilisation. Die folgende Tabelle gibt die Verhältnisse während der Gärung bei 18° C wieder.

Tag der Probeentnahme	Gew. neutr. Gelatine	2/10 Traubenzuckergelatine + CaCO <sub>3</sub>	Rübensaftgelatine + CaCO <sub>3</sub>	Barszcz-Gelatine	Menge der säurebild. Kationen auf CaCO <sub>3</sub> haltiger Nährböden	Die Gesamtazidität in 100 cm in 1/10 n KOH
II.	129.840.000	121.220.000	24.120.000	20.824.000	21.000.000	3·2 cm <sup>3</sup>
III.	243.820.000	282.070.000	381.900.000	367.830.000	265.307.000	11·0 "
IV.	220.710.000	231.210.000	286.395.000	205.004.000	270.200.000	24·0 "
V.	144.800.000	156.440.000	186.400.000	172.800.000	186.400.000	35·2 "
VI.	104.600.000	107.200.000	126.320.000	52.000.000	126.320.000	49·5 "
VII.	21.300.000	38.400.000	40.800.000	17.900.000	40.800.000	59·4 "
VIII.	18.400.000	14.400.000	19.200.000	12.800.000	19.200.000	65·6 "

Aus den angeführten Zahlen ersehen wir, daß in den ersten Tagen ein lebhaftes Wachstum von Mikroorganismen, hauptsächlich nicht säurebildenden, erfolgt. Unter ihnen nehmen Formen aus der Gruppe der Heubazillen, welche die Gelatine verflüssigen und Sporen bilden den ersten Rang ein. Daneben treten auch häufig esterbildende, gelatine-auflösende Bakterien auf. Auch die während der ersten Tage der Gärung ausgesäten Platten besitzen einen starken Estergeruch. In den folgenden Tagen trifft man die esterbildenden Organismen immer seltener an. Sie schwinden allmählich nach Maßgabe der anwachsenden Säure im Verein mit den anderen nicht säurebildenden Bakterien. Schon nach 3 Tagen treten an ihre Stelle Säurebildner, in erster Linie das *Bact. betae viscosum*, das sich am Ende der Gärung fast in Reinkultur im Barszcz befindet. Aus diesen Zahlen erfolgt gleichzeitig, daß die besten Nähr-



substrate für dieses Bakterium unter den benützten diejenigen darstellen, die den Rübensaft zur Grundlage haben, fernerhin, daß es sogar eine ziemlich hohe Azidität ganz gut verträgt. Eine ähnliche, nochmals in einer anderen bei Zimmertemperatur hergestellten Sauerbrühe unternommene Untersuchung führte zu einem analogen Ergebnis.

Diese, sowie die oben angeführten Untersuchungen ergaben demnach einwandfrei, daß der Mikroorganismus, der im vergährten Barszcz der Menge nach die erste Stelle einnimmt, das später genauer beschriebene *Bact. betae viscosum* ist; wahrscheinlich war es auch, daß dieses allein die Gärung hervorruft. Um den Beweis für diese Ansicht zu erbringen, war es nur nötig im sterilisierten Rübensaft die charakteristische Gärung mit Hilfe einer Reinkultur dieses Bakteriums hervorzurufen. Zu dem Zwecke wurden sorgfältig gereinigte gesunde rote Rüben einige Male mit sterilisiertem Wasser ausgewaschen, geschält, in Scheiben geschnitten und schließlich jede Scheibe an der Oberfläche abgeflammt. Die Scheiben kamen in weithalsige Glaskolben, die mit sterilisiertem Leitungswasser gefüllt waren. Dieser Aufguß wurde mit einer reinen Kultur des Barszcz-Bakteriums besiecht und in Zimmertemperatur aufgestellt. Die Gärung nahm den gewöhnlichen Verlauf; nach 7—8 Tagen besaß die auf diese Weise hergestellte Sauerbrühe alle Eigenschaften eines guten Barszcz. Sie stellte eine leicht fadenziehende Flüssigkeit von himbeerroter Farbe und angenehm süßsaurem Geschmack dar; nur fehlte ihr der eigentümliche aromatische Geruch.

### Spezielle Beschreibung der reingezüchteten Mikroorganismen.

#### *Bacterium viscosum betae.*

Morphologie. Auf Nährböden, die keinen Zucker enthalten, gezüchtet, erscheint es in Gestalt von kurzen Stäbchen, die beim ersten Anblick den Eindruck von ovalen Kokken machen.

Dieselben sind 0.6  $\mu$  dick, 0.8—1  $\mu$  lang, an den Enden abgerundet, seltener zugespitzt; sie liegen einzeln, oder zu zweien, manchmal auch mehrere zusammen zu kurzen oder längeren Ketten vereint. Im Beginn der Teilung verlängern sie sich, wobei man in ihrer Mitte eine helle Lücke wahrnehmen kann, wie bei der Bildung von Sporen. An dieser helleren Stelle verengert sich das Stäbchen und bald darauf sieht man zwei kurze, locker mit ein-



ander verbundene Doppelstäbchen auftreten. Längere Kettenbildungen, die bei der geringen Länge der Stäbchen lebhaft an Streptokokken erinnern, finden sich besonders häufig in älteren Kulturen auf rohrzuckerhaltigen Nährböden, besonders auf Rübenauszügen. Dort kann man neben Kettenbildungen auch einzelne, weit längere Stäbchen beobachten, die häufig durch hellere Stellen unterbrochen sind, was augenscheinlich durch unvollendete Teilungsvorgänge zu erklären ist. Außerdem ist auch die Form einzelner Stäbchen in solchen Kulturen etwas abweichend. Es finden sich nämlich Gebilde, die an den Enden keulenförmig verdickt, oder in der Mitte verengert, oder spindelförmig zugespitzt sind. Derartige Bilder erscheinen besonders häufig im vollständig vergohrenen Barszcz. Sie dürften als Degenerationsformen infolge des hohen Säuregrades aufzufassen sein.

In frischen Kulturen sowie auf nicht zuckerhaltigen Nährböden treten ausschließlich die kurzen an Kokken erinnernden Formen auf. Das Bakterium der roten Rübengährung ist unbeweglich und bildet keine Sporen, färbt sich intensiv mit Anilinfarben, auch nicht in den von stark verschleimten Zuckerlösungen stammenden Kulturen, weder bei gewöhnlicher Färbung, noch bei Anwendung spezieller Methoden. Dagegen ließ sich in solchen, stark verschleimten Zuckerlösungen, bei Anwendung des hängenden Tropfens, eine helle, die einzelnen Stäbchen umgebende, das Licht starkbrechende Zone mit nur schwach angedeutetem äußeren Rande beobachten, was augenscheinlich als Ausdruck der schleimigen Umwandlung der Membran aufzufassen ist.

#### Gelatinekulturen.

Gewöhnliche Gelatine. Kulturen auf neutralen oder schwach alkalischen Gelatineplatten bei einer Temp. von 18—20° C, stellen winzige Kolonien von 0·3—0·5 mm dar, die sich leicht über die Oberfläche wölben, sich jedoch nicht auf derselben ausbreiten. Bei 135-facher Vergrößerung erscheinen sie rund mit gleichmäßigen Rändern, in durchfallendem Lichte von goldgelber Farbe, mit feinkörnigem Bau und durchscheinender Umrandung. Die tieferen Kolonien sind ebenfalls rund, graugelb gefärbt. Nach einigen Tagen beträgt ihr Durchmesser höchstens 0·6 mm und wächst nicht weiter.

Strichkulturen geben einen zarten Anflug aus sehr kleinen, durchsichtigen, tautropfenähnlichen Kolonien. Dieser Anflug dehnt sich nicht weiter auf der Gelatineoberfläche aus.



In Stichkulturen erfolgt nur sehr geringes, kaum erkennbares Wachstum. An der Oberfläche bildet sich um die Stichöffnung ein dünnes durchsichtiges Häutchen von 1—2 mm Durchmesser mit runden Rändern, die sich nicht weiter ausdehnen. Die Gelatine wird nicht verflüssigt.

2<sup>o</sup>/<sub>o</sub> Traubenzuckergelatine. Auf Platten entstehen bei Zimmertemperatur einige Tage nach der Aussaat an der Oberfläche der Gelatine runde Kolonien von 1—2 mm Durchmesser im reflektierten Licht von gelblich weißer, im durchfallenden von blaßgelber Farbe, von kleinkörnigem Bau, mit durchscheinenden Rändern, während die mittleren Teile dunkler sind. Die tiefgelegenen Kolonien sind ebenfalls rund, seltener oval, dunkelgelb gefärbt.

Strichkulturen rufen ein viel lebhafteres Wachstum, als diejenigen auf gewöhnlicher Gelatine hervor; es entsteht ein weißes, dünnes, durchscheinendes Häutchen, das etwas über den Impfstrich herauswächst. Der Rand dieses Häutchens irisiert etwas und ist scharf begrenzt; eine besondere Zeichnung läßt er nicht erkennen.

Stichkulturen. Auf der Oberfläche an der Stichöffnung dehnt sich allmählich ein weißlicher, schwach erhabener Belag aus, mit gleichmäßigen scharf begrenzten Rändern. Den Stichkanal entlang zieht sich das Wachstum in Gestalt eines dicken, weißen einheitlichen Fadens hin, der bis zum Boden des Kulturröhrchens reicht.

Rübensaftgelatine. Plattenkolonien ergeben ein außerordentlich charakteristisches Bild. Schon nach 48 Stunden erscheinen auf der Oberfläche der Gelatine durchsichtige Tröpfchen, die sich von Tag zu Tag vergrößern. Nach einigen Tagen nehmen die anfangs runden Kolonien häufig unregelmäßige Formen an, infolge der großen Menge des entstandenen Schleimes und des Zusammenfließens mit benachbarten Kolonien, wobei sie sich kuppelförmig über die Oberfläche erheben in Gestalt von großen Schleimtropfen, deren Durchmesser  $\frac{1}{2}$  cm und mehr beträgt. Die anfangs durchsichtigen Kolonien trüben sich mit der Zeit und klären sich später (nach etwa zwei Wochen) wieder. Dann bemerkt man am Grunde der großen durchsichtigen Tropfen einen weißen Bodensatz. Die Kolonien enthalten eine dicke schleimige Flüssigkeit, die bei der Berührung mit der Platinnadel sich in Fäden ausziehen läßt. Bei 50-facher Vergrößerung zeigen die Kolonien durchsichtige scharfbegrenzte gleichmäßige Ränder, bei undurchsichtiger Mitte. Dieselben sind gelblich gefärbt und kleinkörnig.



Strichkulturen auf Rübengelatine zeigen ebenfalls ein charakteristisches Aussehen. Bei Zimmertemperatur entsteht nach 2—3 Tagen den Strich entlang eine glänzende einwenig trübe Schleimwulst, die sich von Tag zu Tag vergrößert, und nachher auf den Boden sinkt, wo der sich abscheidende Schleim oftmals eine bis ein cm hohe Schicht bildet. Die sich anfangs dort ansammelnde Schleimmenge ist trüb und dickflüssig, später (nach ungefähr 2 Wochen) wird dieselbe wässerig und durchsichtig, während sich unter ihr ein weißer Bodensatz abscheidet.

Stichkulturen ergeben schon nach 48 Stunden an der Stichöffnung einen trüben allmählich anwachsenden und sich hervorwühlenden Schleimüberzug. Ebenso erfolgt den Stichkanal entlang ein reichliches Wachstum unter Ausscheidung von erheblichen Schleimmengen. Dieselben drängen die Gelatine in der Tiefe auseinander und erfüllen die so entstehenden Risse.

#### 10-20%-ige Rohrzuckergelatine.

Die hier entstehenden Kulturen des *Bact. betae visc.* entsprechen vollständig dem Bilde auf Rübengelatine, mit dem einzigen Unterschiede, daß die Konsistenz des gebildeten Schleimes bei dem hohen Zuckergehalt erheblich dicker ist. Auf Zucker oder Rübengelatineplatten mit Zusatz von Calcium-Karbonat entsteht um die Kolonien ein 1—2 mm breiter heller Hof von aufgeklärter Gelatine infolge der Auflösung von  $\text{CaCO}_3$  durch die entstandenen organischen Säuren.

#### Agarkulturen.

Gewöhnl. neutr. Agar. Bei Zimmertemperatur gehaltene Plattenkulturen weisen nach einigen Tagen winzige Kolonien von vollständig ähnlichem Aussehen wie auf Gelatineplatten auf.

Strichkulturen ergeben einen sehr zarten Anflug, der anfangs aus ganz kleinen, durchsichtigen, tautropfen-ähnlichen Kolonien besteht, die später zu einem dünnen durchsichtig glänzenden Überzug zusammenfließen, wobei es jedoch nicht zur Schleimbildung kommt.

2%-iger Traubenzuckeragar. Auf Platten wie Strich- und Stichkulturen zeigt das Bakterium ein vollständig analoges Wachstum, wie auf Traubenzuckergelatine.

Eine besondere Beschreibung erfordert jedoch sein Verhalten auf Agar bei Zusatz von 10% Rohrzucker sowie auf Rübengar. Auf Platten dieser Nährböden ausgesät bildet das *Barszcz-*



Bakterium bei Zimmertemperatur flache, schleimige Kolonien von  $\frac{1}{2}$ —1 cm Durchmesser. Eine Hervorwölbung über die Oberfläche findet nicht statt, im Gegenteil wird der Agar in der Umgebung der Kolonien leicht ausgehöhlt infolge der Auflösung. Beim Anwachsen der Kolonien wird der Nährboden immer mehr aufgelöst, so daß besonders an den Rändern der Platten eine Art Erosion entsteht, wobei jedoch niemals die ganze Agaroberfläche verflüssigt wird.

Auf Strichkulturen gibt sich die Entwicklung des *Bact. betae viscosum* zuerst durch reichliche, den Strich entlang laufende Bildung von Schleim zu erkennen, der jedoch bald auf der Agaroberfläche sich ausbreitet und in dem unteren Teil des Röhrchens sich bis zu  $\frac{1}{2}$  cm hoher Schicht ansammelt. Nach einigen Tagen jedoch beginnt von unten aufsteigend eine Erweichung und Verflüssigung des Agars und wenn dieser nicht zu konzentriert ( $1\frac{1}{2}\%$ ) war, erweicht der Nährboden der ganzen Länge nach und fließt von der Wand des Röhrchens sich ablösend zu Boden. Immer aber bleibt ein großer Teil des Agars unverflüssigt.

Besonders prägnant tritt diese Erscheinung bei Stichkulturen in hochgeschichtetem 10—15%-igem Rohruckeragar auf. Die Oberfläche des Agars bedeckt sich in 2 Tagen mit einer dickflüssigen Schleimschicht; den Impfkanal entlang entsteht ein breiter Streifen mit verschwommenen Rändern, der eine lebhaft mit Schleimabscheidung verbundene Bakterienvegetation verrät. Nach einigen Tagen sprengen die im Stichkanal entstandenen Schleimmassen den Nährboden und bilden eine breite bis zum Boden reichende Spalte. Der darin angesammelte Schleim fließt ab und sammelt sich am Boden des Röhrchens an, den sich allmählich auflösenden Agar verdrängend. Gleichzeitig erfolgt der Auflösungsprozeß von der Agaroberfläche aus, besonders an ihren Rändern, so daß nach einigen Tagen der Nährboden sich von der Röhrchenwand ablöst und nach 7—10 Tagen ein erweichter nach unten verjüngter und von einer Spalte zerrissener Agarpfropfen in der dicken, trüben Schleimflüssigkeit schwimmt. Weiter schreitet jedoch die Auflösung des Agars nicht vor. Am Boden der Probierröhre sammelt sich in den nächsten Tagen ein weißer flockiger Niedersehlage an, während die darüberstehende Flüssigkeit durchsichtig wird.

Ob wir es bei der Verflüssigung dieses Nährbodens mit einer Art Fermentation des Agars selbst zu tun haben, oder mit einer einfachen Auflösung, habe ich bisher nicht näher untersucht.



### Kulturen auf flüssigen Nährböden.

Gew. Bouillon erwies sich als ein nicht geeigneter Nährboden für das *Bact. betae visc.* Die Flüssigkeit bleibt nach der Impfung durchsichtig und verrät keinerlei lebhaftere Bakterienvegetation. Nach einigen Tagen jedoch kann man beim Umschütteln eine kleine Menge Bodensatz in der Röhre bemerken. Die Bouillon verändert jedoch dabei weder ihre anfängliche alkalische Reaktion, noch ihre Konsistenz; ebensowenig ist Indol nachweisbar.

Auf 2—3%-iger Traubenzuckerbouillon läßt sich schon ein lebhafteres Wachstum beobachten. Eine solche mit Barszczbakterien geimpfte Nährflüssigkeit trübt sich, bei Zimmertemperatur belassen, anfangs gleichmäßig, und nach einigen Tagen sammelt sich ein ziemlich reichlicher lockerer Niederschlag am Boden an. Im Gährungsröhrchen entwickelt eine solche Kultur keine Gase, wiewohl die Reaktion der Flüssigkeit ausgesprochen sauer wird.

Ganz ebenso verhält sich das Barszcz-Bakterium auf Bouillon, die mit Laktose, Maltose, Lävulose und Raffinose versetzt ist; alle diese Nährlösungen vergähren gleichfalls ohne Schleimbildung und zwar ganz unabhängig von der Höhe des Zuckergehaltes. Ähnlich entwickelt sich das Bakterium auch auf 1—2%-iger Rohrzuckerbouillon, ganz anders dagegen bei höherem Rohrzuckergehalt. Bei einem Zusatz von 3% Zucker zeigt die Nährflüssigkeit unter dem Einflusse des Bakteriums bei Temp. von 17—16°C schon nach wenigen Tagen fadenziehende Konsistenz.

Bei einem höheren Gehalt von etwa 10—20% verwandelt sie sich in kurzer Zeit in eine Gallertmasse. Diese Gährung, welche die Entstehung verhältnismäßig großer Säuremengen begleitet, findet ohne Gasentwicklung statt.

Bei Versuchen in Gährungsröhrchen kann man zwar nach einigen Tagen einige Gasblasen an der Spitze des Apparates bemerken, aber diese geringe Gasmenge wächst nicht weiter, sogar nicht nach Ablauf mehrerer Wochen. Um festzustellen, welcher Rohrzuckergehalt der Entwicklung des Barszcz-Bakteriums am besten zusagt, wurde dieses auf einer Reihe von Bouillon-Nährböden mit verschiedenem bekannten Zuckerzusatz ausgesät. Dabei ergab sich, daß die stärkste Vegetation bei 1—20% Zucker erfolgt, bei 30—40% dieselbe noch ziemlich ausgesprochen ist, bei 50—60% nur eine schwache Entwicklung erfolgt und bei höheren Gehalt als 70% dieselbe voll-





ständig aufhört. Die größte Schleimproduktion erfolgt bei einem Gehalt von 5—20% Rohrzucker, obwohl auch Kulturen bei 50—60% Rohrzuckerzusatz deutliche Schleimbildung zeigen. Ähnlich wie auf den beschriebenen Nährflüssigkeiten verhält sich das *Bacterium betae viscosum* auf sterilisiertem Rübenextrakt. Nach der Impfung verändert sich diese Nährflüssigkeit bei Temp. von 17—18° schon nach 3 Tagen zu einer gallertartigen schleimig dickflüssigen Masse; dieselbe trübt sich und sondert eine ziemlich erhebliche Menge schmierigen Bodensatzes ab.

Die angegebene Temperatur ist sowohl für die schleimige Gärung wie auch für die Entwicklung des Bakteriums die geeignetste; denn schon bei 25° erzeugt dasselbe auf dieser Nährflüssigkeit keinen Schleim und bei 37° ist sein Wachstum nur noch schwach. Milch bringt es nach 6 Tagen zur Gerinnung, indem ein kompaktes Gerinsel unter Abscheidung von reinem leicht opalisierendem Serum entsteht. Lackmuspapier wird durch dasselbe stark rot gefärbt.

#### Kulturen auf Kartoffeln und roten Rüben.

Auf Kartoffeln ruft das Barszcz-Bakt. nur einen schwachen, kaum sichtbaren Anflug hervor, der sich auf der Oberfläche nicht weiter ausbreitet. Schleimbildung findet dabei nicht statt.

Auf roten Rüben entsteht schon 2 Tage nach der Impfung ein glänzender karminroter Überzug, der über die Oberfläche des Rübenquerschnittes sich ergießend auf den Boden des Gefäßes abfließt.

#### Biologische Eigenschaften.

Das *Bact. betae viscosum* entwickelt sich, wie ersichtlich, am besten auf rohrzuckerhaltigen Nährböden bei 18—22° C, bei einer Temp. von über 25° C wächst es zwar noch ziemlich gut, bildet jedoch nur sehr wenig Schleim; bei 37° wächst es nur noch sehr schwach; bei noch höherer Temp. hört sein Wachstum zunächst auf und es stirbt bei 48° C nach 5 Stunden, bei 50° C nach einer Stunde und bei 64° C schon nach 5 Minuten ab.

Das Bakterium ist relativ anaërob. In sauerstofffreier Atmosphäre entwickelt es sich gleich gut und erzeugt die ihm eigentümliche Gärung. Es entwickelt sich ohne Unterschied auf schwach alkalischen, neutralen, sowie saueren Nährböden besonders bei Gegenwart von Zucker. Außerordentlich widerstandsfähig ist es gegen Säure-



einwirkung. Auf Rohrzuckerbouillon entwickelt es sich bei Gegenwart von 0·4% Milchsäure noch sehr gut unter reichlicher Schleimbildung; bei 0·5% Milchsäure wächst es ebenfalls noch, obgleich es dabei nur sehr wenig Schleim erzeugt. Sein Wachstum hört erst bei Gegenwart 0·7% Milchsäure vollständig auf. Auf künstlichen Nährböden ohne Eiweißkörper entwickelt sich das Barszcz-Bakt. nur spärlich trotz Zusatz von Rohrzucker und Ersetzung der Eiweißkörper durch andere stickstoffhaltige Verbindungen wie z. B. weinsaures Ammonium, Asparagin etc. Mangel an Feuchtigkeit verträgt es ziemlich gut und seine Lebensfähigkeit erhält sich auf künstlichen Kulturen monatelang. Von chemischen Produkten, die in Kulturen des Bact. betae viscosum auftreten, verdienen in erster Reihe die verhältnismäßig reichlichen Säuremengen Erwähnung.

Solche Säuremengen erzeugt das Bakterium jedoch nur auf zuckerhaltigen Nährböden. Zur näheren Feststellung dieses Verhaltens wurden die einzelnen Nährböden, denen Dextrose, Saccharose, Maltose in Mengen von je 2% zugesetzt waren, mit dem Barszcz-Bakt. geimpft und bei Zimmertemperatur aufgestellt. In dem so erhaltenen Materiale wurde von Tag zu Tag die Gesamtsäure bestimmt.

Siehe Tafel Seite 24.

Aus den angeführten Zahlen ersehen wir, daß Trauben-, Rohrsowie Malzzucker in gleich lebhafter Weise von dem B. zersetzt werden. Die Gärung des Rohrzuckers steigt jedoch am schnellsten bis zur höchsten Grenze an, da der Säuregehalt des rohrzuckerhaltigen Nährbodens bereits nach 7 Tagen sein Maximum erreicht hat; andererseits bilden die größte Säuremenge Bouillon-Kulturen mit Malzzuckerzusatz. Die Zersetzung des Milchzuckers geht sehr langsam vor sich. An der Gesamtsäure beteiligen sich, wie ich mit Hilfe der später zu beschreibenden Methoden feststellte, ausschließlich Milch- od. Essigsäure. Ihr Verhältnis in den einzelnen zuckerhaltigen Nährböden nach Erreichung des höchsten Gesamtsäurewertes war folgendes:

Siehe Tafel Seite 24.



Tag der Probe- entnahme	Laktose- Bouillon	Dextrose- Bouillon	Saccharose- Bouillon	Maltose- Bouillon
I.	0.1	0.3	1.4	1.8
II.	0.4	2.4	3.3	3.6
III.	2.5	3.4	4.7	4.8
IV.	2.8	5.3	6.0	8.2
V.	3.0	6.1	7.4	9.1
VI.	3.3	7.0	8.2	10.4
VII.	4.5	7.6	8.2	11.4
VIII.	5.3	8.1	—	12.0
IX.	5.3	8.3	8.2	12.0
X.	—	8.3	8.2	12.0
XI.	5.5	8.3	8.2	12.0
XII.	5.7			
XIII.	5.9			
XVI.	7.4			
XVIII.	7.4			
XXV.	7.4			

von 100 cm<sup>3</sup>  $\frac{1}{10}$  n KO H (der Gesamtazidität entsprechend)

entfallen auf:	Laktose- Bouillon	Dextrose- Bouillon	Saccharose- Bouillon	Maltose- Bouillon
Essigsäure .	30.5	35.5	48.5	25.3
Milchsäure .	69.5	64.5	51.5	74.7

Außer den angeführten Zuckerarten vermag das Barszcz-Bakt. auch Lävulose und Raffinose in Milch- und Essigsäure zu zerlegen. Andere Kohlenhydrate wie z. B. Dextrin greift es nicht an, obwohl es auf dextrinhaltigen Nährböden einiges, wenn auch geringes Wachstum erzeugt; auf mannithaltigen Nährböden entwickelt es sich nicht.



Die Gährung, welche das Barszcz-Bakt. auf Rübenextrakt und anderen stärker rohrzuckerhaltigen Nährböden erzeugt — denn das interessiert uns am meisten — verläuft in der oben dargestellten charakteristischen Weise. Dabei entsteht neben Essig- und Milchsäure noch ein Schleimkorper (Dextran) und auch Mannit, den ich auf dem unten beschriebenen Wege nachweisen konnte. Die Gährung besitzt also in diesem Falle alle Eigenschaften der sogenannten schleimigen Gährung. Im Verlaufe derselben unterliegt ein Teil des Rohrzuckers der Inversion, da solche Kulturen schon nach 3 Tagen direkt Fehlingsche Lösung reduzieren.

In Erwägung dessen, daß das Bakt. bei der Gährung des Barszcz immer auftritt, lag die Annahme nahe, daß es mit den Rüben zugleich in den Aufguß gelangt, zumal da nach Boekhut ähnliche Schleimbildner sich auf Pflanzen, im Wasser u. a. a. O. befinden. Um die Herkunft des *B. visc.* festzustellen, bereitete ich einen Rübenaufguß in der Weise, wie der Barszcz gewöhnlich bereitet wird, indem ich jedoch nach Möglichkeit das Hineingelangen von Mikroorganismen aus der Außenwelt zu verhindern suchte. Zu dem Zwecke wurden mit sterilem Wasser gereinigte rote Rüben auf einer Glasplatte unter einer Glocke geschält und in Scheiben geschnitten. Es ist überflüssig hervorzuheben, daß das Messer, die Platte und andere benutzte Gegenstände vorher sterilisiert worden waren. Die Rubenscheiben kamen in weithalsige Glaskolben, die bis zu einem Drittel mit sterilem Wasser gefüllt waren. Nach Verschluf der Kolben mit Wattepfropfen wurden dieselben 7 Tage hindurch bei Zimmertemperatur belassen. Solche Aufgüsse wurden von 4 verschiedenen Rubengattungen bereitet. Nach einer Woche wurden aus den einzelnen Kolben Proben entnommen und nach entsprechender Verdünnung auf Rüben-Gelatine Platten geimpft. Das Resultat entsprach nicht den gehegten Erwartungen: nur in einer Probe ließ sich das *Bact. betae visc.* nachweisen, in den drei anderen fand sich ein Gemisch von Spaltpilzen und fremden Bakterien, was auch durch den unangenehmen Geruch der Aufgüsse bestätigt wurde.

Daraus ergibt sich, daß das Barszcz-Bakt. auf den roten Rüben nicht konstant vorkommt. Daher empfahl es sich zu untersuchen, ob es sich nicht in der Luft findet. Zu diesem Behufe wurden 6 weithalsige Kolben mit Rübenauszug, der im Wasserdampfe sterilisiert worden war, in verschiedenen Zimmern des hyg. Inst. aufgestellt und eine Woche hindurch offen stehen gelassen. Schon nach 4 Tagen



war in drei Kolben eine Verschleimung des Aufgusses zu erkennen und nach 7 Tagen war die charakteristische Gährung in 4 Kolben bemerkbar, in denen auch neben den Schimmelpilzen das Barszcz-Bakt. sich fand. Das letztere war nur in den 2 Proben, deren Inhalt auch bis zum Ende des Versuches dunnflussig blieb, nicht nachweisbar. Daher unterlag es keinem Zweifel, daß das wirksame Bact. betae visc. aus der Luft in den Aufguß gelangt, obwohl seine Gegenwart an der Oberfläche der Rüben oder in der Erde nicht ausgeschlossen ist.

Die schleimige Gährung des Rohrzuckers, die von anderen äußerlich ähnlichen Prozessen wie z. B. der Verschleimung der Milch zu unterscheiden ist, ist schon lange bekannt. Ebenso kennt man eine ganze Reihe von Mikroorganismen, welche diese Gährung hervorrufen. Zu den am längsten bekannten gehört vor allem der von Cienkowsky<sup>1)</sup> entdeckte und später von Liesener und Zopf beschriebene *Leuconostoc v. streptococcus mesenteroides*, der im Rübensaft gefunden wird, und der darin außerordentliche Mengen einer gallertartigen, froschlauchahnlichen Substanz erzeugt.

Diese Substanz hält Scheibler<sup>2)</sup> für eine in Wasser unlösliche Abart von Dextran. Von dem Barszcz-Bakt. unterscheidet sich der *Leuconostoc mes.* prinzipiell dadurch, daß er typische Kokken darstellt, die sich zu Ketten anordnen, ähnlich dem *Streptococcus*. Außerdem besitzt er eine dicke Schleimhülle. Ferner ist sein Verhalten und sein Wachstum auf Nährböden abweichend. Er erzeugt nämlich auf rohrzuckerhaltigen Nährböden mächtige Belage, die sich durch ihre knorpelartige Konsistenz von dem dünnen, löslichen Schleimuberzuge, den das Barszcz-Bakt. erzeugt, unterscheiden.

Das *Bacterium gelatinosum betae* (Glaser)<sup>3)</sup>, ebenfalls aus gallertigem Rübensaft isoliert, sowie *Bacillus viscosus* (Kramer)<sup>4)</sup> lösen Gelatinenahrboden ziemlich lebhaft auf, außerdem besitzt das erstere deutliche Eigenbewegung. Ähnlich verhält sich das *Bact. gummosum* (Ritsert)<sup>5)</sup>, das sich vom Barszcz-Bakt. durch die Fähig-

<sup>1)</sup> Die Gallertbildungen des Zuckerrubensaftes. Charkow. 1878.

<sup>2)</sup> Scheibler. Über die Natur des Froschlauches. Zeitschrift für Zuckerrüben-Industrie. 1874.

<sup>3)</sup> Centr. f. B. 2. Abt. Bd. I. 1895.

<sup>4)</sup> Sitzungsbericht der k. Akad. d. Wissensch. Wien 1889.

<sup>5)</sup> Berichte der pharm. Ges. Bd. I. 1891. Centr. f. B. Bd. VI. 1892.



keit der Eigenbewegung und abweichendes Verhalten auf Nährböden unterscheidet, sofern dasselbe überhaupt in Reinkulturen erhalten war, was jedoch dessen Entdecker nicht überzeugend nachzuweisen vermag. Dagegen besitzen große Ähnlichkeit mit unserem Bakt. folgende als Kokken beschriebene Organismen: *Streptoc. hornensis* (Boekhut)<sup>1)</sup>, *Microc. gelatinogeneus* (Bräutigam)<sup>2)</sup>, *Micrococcus gummosus* (Happ)<sup>3)</sup>. Zur Erleichterung des Vergleiches füge ich eine Tafel bei, auf der die Eigenschaften der drei Kokkenarten und des Bact. betae visc. nebeneinander eingetragen sind.

Siehe Tafeln Seite 28—36.

Obwohl der Vergleich sich nicht exakt in allen Einzelheiten durchführen läßt infolge nicht genügend genauer Beschreibung der genannten Kokkenarten, machen sich doch bei der Durchsicht der oben angeführten Tabelle neben ähnlichen Zügen ausgesprochene Unterschiede besonders im chemischen Verhalten bemerkbar.

Außer dem beschriebenen Bact. betae viscosum traf ich, wie die Tabelle auf Seite 24 zeigt, sehr häufig gewisse Mikroorganismen an, die durch die Fähigkeit einen starken, angenehmen Estergeruch zu erzeugen, Aufmerksamkeit erregten. In besonders großer Zahl fand ich sie in 2—3 Tage altem Rübenaufguß. In 7-tägigem Barszcz sind sie nur noch in geringer Menge vorhanden, indem sie durch das Bact. betae visc. bei dem ansteigenden Säuregehalt der Flüssigkeit verdrängt werden. Den vorgenannten Mikroorganismen verdankt der Barszcz seinen angenehmen Obstgeruch. Es gelang mir aus gewöhnlichem Barszcz 2 Abarten dieser Mikroorganismen zu isolieren. Diese unterscheidet ich als esterbildendes Bakterium Nr. I u. Nr. II.

#### Das esterbildende Bakterium Nr. I.

stellt sich in Gestalt von kurzen ziemlich dicken Stäbchen dar von 0.6—0.8  $\mu$ . Dicke u. 1.2—3.4  $\mu$ . Länge. In älteren Kulturen trifft man

<sup>1)</sup> Centr. f. Bakt. 2 Abt. Bd. VI. 1900.

<sup>2)</sup> Pharm. Centralhalle Bd. 32. 1891 H. 30.

<sup>3)</sup> Bakteriolog. und chem. Unters. über die schleimige Gährung Inaug. Diss. Berlin 1893.



Streptococcus horrensis	Micrococcus gelatinigenus	Micrococcus gummosus	Bact. betae viscosum
Streptococcus.	<p>Auf zuckerfreien Nährböden gezüchtet stellt derselbe eine Kokkusform dar, deren Größe und Gestalt einem Staphylokokkus entsprechen. Vor seiner Teilung beginnt sich der Mikrokokkus zu strecken. In dieser Form, welche man bei denen auf zuckerhaltigen Gelatinenährböden gezüchteten Micrococcus gel. sehr häufig beobachten kann, kommt er einem kleinen Kurzstäbchen sehr nahe.</p>	<p><b>Morphologisches Verhalten.</b> Kleine runde Kokken von 0.4 <math>\mu</math> Durchmesser, die meistens zu zweien zusammenliegen, also als Diplokokken auftreten. Nur selten waren 4—6 Kokken an einander gelagert zu bemerken, öfters waren sie zu Häufchen vereinigt. Eigenbewegung war nicht zu bemerken.</p>	<p>Kurze Stäbchen 0.5 <math>\mu</math> dick, 0.8—1 <math>\mu</math> lang, mit abgerundeten Enden, sie liegen einzeln oder zu zweien, manchmal auch mehrere zusammen in kurzen oder längeren Ketten vereint. Auf zuckerfreien Nährböden gezüchtet, bildet derselbe noch kürzere Gebilde, die der Kokkusform sehr nahe stehen. Besitzt keine Eigenbewegung.</p>
<b>Färbbarkeit.</b>			
<p><b>Bouillon-Kulturen. a) Bouillon ohne Zuckerzusatz.</b></p>			<p>Färbt sich gut mit den üblichen Anilinfarben, auch nach Gram.</p>
<p>Sehr schwaches Wachstum; die Flüssigkeit bleibt klar, erst nach einigen Tagen läßt sich ein kaum bemerkbarer Bodensatz wahrnehmen.</p>			



## b) 2% Dextrose-Bouillon.

Starke Trübung, nach einigen Tagen ein reichlicher Bodensatz.

## c) 10% Saccharose-Bouillon.

Bildet Gelatinose und Säuren. Es treten dabei Säuren auf.

Bei 17—20° C gezüchtet macht es die Nährlösung trübe und verwandelt sie in eine gallertig-schleimige Masse, infolge der Bildung von Dextran.

## Gelatine-Kulturen. a) Gew. Gelatine-Platten.

Bei 20° C erscheinen die Kolonien nach etwa 48 Stunden als sehr kleine weiße Pünktchen, welche sich unter dem Mikroskop darstellen wie kugelförmige, scharf begrenzte Kolonien, mit grau-bräunlichem matten Schimmer bei Beobachtung mit durchfallendem Lichte. Übrigens nimmt man keine besondere Zeichnung an der Oberfläche wahr, es sei denn, daß hier und da schwache Punktierung vorkommt. Nach 5 Tagen erreichen die Kolonien einen Durchmesser von 0·2 mm. Die nahe an der Oberfläche lie-

Die Platten zeigen erst nach 4—5 Tagen kleine, feine Pünktchen, die bei 150-facher Vergrößerung als runde, glattrandige, gelblich gefärbte Kolonien erscheinen, die im Zentrum ein gleichmäßiges haariges Gewebe zeigen.

Später nimmt die Kolonie etwas an Größe zu (bis  $\frac{2}{3}$  mm), die Farbe wird mehr gelb-braun, die innere Struktur verschwindet vollständig, und die ganze Kolonie erscheint gleichmäßig mit vollständig glatttem Rande. Eine Verflüssigung der Gelatine tritt nicht ein.

Winzige Kolonien von 0·3—0·5 mm Durchmesser, über die Oberfläche leicht erhaben. Bei 135-facher Vergrößerung erscheinen sie rund mit gleichmäßigen Rändern, im durchfallenden Lichte von goldgelber Farbe, mit kleinkörnigem Bau und durchscheinenden Rändern.

Nach einigen Tagen beträgt ihr Durchmesser höchstens 0·5 mm und wächst nicht weiter. Gelatine wird nicht verflüssigt.



Streptococcus hornensis	Micrococcus gelatinigenus	Micrococcus gummosus	Bact. betae viscosum
<p>genden Kolonien breiten sich darüber in Form einer dünnen, durchsichtigen, äußerst feinen Schicht mit scharfem Rande.</p>			
<p>Die Entwicklung im Impfstich ist nur schwach, es entstehen zahlreiche winzige, weiß gefärbte Kolonien. An der Oberfläche bildet sich ebenfalls wieder eine wenig ausgedehnte, sehr dünne, kreisförmige Bakterienvegetation.</p>	<p>Die Kulturen auf zuckerfreier Nährgelatine ließen ein Oberflächenwachstum überhaupt nicht wahrnehmen.</p>	<p>Nach 2—3 Tagen bemerkt man einen feinen Stich von schleierartigem Aussehen. Es entwickelt sich dann allmählich ein dünner, reiner, zäher Faden. Gelatine wird nicht verflüssigt. Oberflächenwachstum ist nicht wahrzunehmen.</p>	<p>Die Entwicklung ist sehr schwach, kaum wahrnehmbar. Auf der Oberfläche bildet sich eine zarte, kreisförmige, durchsichtige Auflagerung, von 1—2 mm Durchm. Das Wachstum längs des Impfstiches ist schwach und fadenförmig.</p>
<b>Stichkulturen in Gelatine.</b>			
<p>Die Kolonien zeigen nach 24 Stunden Entwicklung und bilden für das bloße Auge matte, weiße, ellipsoide Klümpchen. Diejenigen, welche an der Oberfläche liegen, bilden halbdurchsichtige, schnell an Größe zunehmende Tropfen, welche nach einigen Tagen einen Durchmesser von 1/2 cm erreichen. Unter dem Mikroskop sind die Kolonien</p>	<p>Die Kolonien bilden zuerst graue Pünktchen, später feuchtglänzende Tropfen, die allmählich grauweiß werden. Eine Verflüssigung der Gelatine findet durch diese nicht statt. Unter dem Mikroskop erkennt man in den tieferliegenden Kolonien runde, gelbe Häufchen, ohne weitere Besonderheiten. Die an der Oberfläche aber haben das</p>	<p>Auf 10<sup>0</sup>/<sub>0</sub>-iger Rohrzuckerplatte ist das Wachstum bedeutend stärker und die Kokken nehmen eine mehr ovale, gestreckte Form an. Noch deutlicher treten diese Erscheinungen bei Zusatz von 25<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Zucker ein, wobei sogar die Gelatine schwach verflüssigt wird, und die Kokken auch etwas an Größe zunehmen.</p>	<p>Nach 48 Stunden sind auf der Oberfläche der Gelatine durchsichtige Tröpfchen, die sich von Tag zu Tag vergrößern. Nach einigen Tagen nähmen die Kolonien unregelmäßige Formen an infolge der großen Menge des entstandenen Schleimes und des Zusammenfließens mit den benachbarten Kolonien. Dieselben erheben sich kuppelförmig über die Ober-</p>
<b>b) 10—20<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Rohrzuckerplatte.</b>			



in der Gelatine sehr charakteristisch. Die von Haus aus wahrscheinlich runde Kolonie nimmt durch Ablagerung von Gallerte bald eine unregelmäßige manchmal Hutpilzähnliche Form an, mit grobkörnigem Kern und halbdurchsichtiger Umgebung.

Aussehen flacher, ausgebreiteter Gummischleimtropfen, welche später eine grauweiße Färbung annehmen. Sie besitzen in der Mitte eine gelbe Färbung, die gegen den Rand hin verblaßt.

fläche in Gestalt von großen Schleimtropfen, deren Durchmesser  $\frac{1}{3}$  cm und mehr beträgt. Die anfangs durchsichtigen Kolonien trüben sich mit der Zeit, um sich später (nach 2 Wochen) wieder unter Absetzung eines weißen Bodensatzes zu klären.

Die Kolonien enthalten eine dicke schleimige Flüssigkeit, die bei Berührung mit der Platinnadel sich in Fäden ausziehen läßt. Bei 50-facher Vergrößerung zeigen die Kolonien durchsichtige, scharfbegrenzte gleichmäßige Ränder bei un-durchsichtiger Mitte. Dieselben sind gelblich gefärbt und klein-körnig.

Die Stiechkultur wächst sehr rasch, in Form einer schleimigen Wulst, welche schnell an Stärke zunimmt und die Gelatine auseinanderdrückt. Die freie Oberfläche der Gelatine bedeckt sich mit einer starken Schleimschicht.

Die Stiechkulturen in zuckerhaltigem Nährboden lassen ein gleichmäßiges Wachstum längs des ganzen Stiechkanales erkennen und zeigen auf der Oberfläche einen grauweissen, feuchten Belag von mäßiger Ausdehnung.

Wird Gelatinezucker zugesetzt, dann ist das Wachstum stärker, die Gelatine nimmt allmählich eine dicke, schleimige, gummiähnliche Konsistenz an, und der Impfstich verschwindet sehr rasch. Ferner ist dann auch Oberflächenwachstum bemerkbar.

Schon nach 48 Stunden entwickelt sich an der Stiechöffnung ein trüber allmählich anwachsender, sich hervorwölbender Schleimüberzug. Ebenso erfolgt den Stiechkanal entlang ein reichliches Wachstum unter Ausscheidung von erheblichen Schleimmengen. Dieselben drängen die Gelatine in der Tiefe auseinander und erfüllen die entstehenden Risse.

### Stiechkulturen.



Streptococcus hornensis	Micrococcus gelatinosus	Micrococcus gummosus	Bact. betae viscosum
<p>Die Strichkultur entwickelt sich sehr rasch als eine dicke, durchscheinende Gallerte, welche bald die ganze Gelatineoberfläche bedeckt und sich an der Unterseite stark anhäuft zu einer 2,5 cm. hohen Schicht innerhalb 10 Tagen. In dieser Gallerte stehen einzelne Gasblasen, aber erst nach längerer Zeit.</p>	<p>Es zeigt sich zuerst ein gleichmäßiges Wachstum längs des Impfstriches; später entwickelt sich der Mic. gelatinosus besonders mächtig an der Oberfläche. Es entsteht ein grauweiß schimmernder, mäßig dicker feuchter Belag, dessen Ansehen am ehesten mit dem eines dünn aufgestrichenen Ungt. Glycerini zu vergleichen ist. Bei älteren Strichkulturen fließt ein Teil der schleimigen Kultur nach dem unteren Ende ab und bildet eine grauweiße, glänzende, undurchsichtige Schichtung.</p>	<p><b>Strichkulturen.</b></p>	<p>Nach 2 - 3 Tagen entsteht den Strich entlang ein glänzender, leicht trüber Schleimwulst, der sich von Tag zu Tag vergrößert und nachher nach dem unteren Ende herabfließt, wo er eine bis 1 cm hohe Schleimschicht bildet. Die sich ansammelnde Schleimmenge ist anfangs trüb und dickflüssig, später wird sie wässrig und durchsichtig, während sich unter ihr ein weißer Bodensatz abscheidet.</p>
<p>Auch ohne Zucker läßt sich Streptoc. hornensis auf Agar züchten.</p>	<p>Auf Agar-Agar bietet das Wachstum etwas Besonderes nicht dar.</p>	<p><b>Kulturen auf gew. Agar.</b></p> <p>Wachstum sehr schwach. Erst nach 10 - 12 Tagen bemerkt man längs des Impfstiches einen dünnen, mattglänzenden, farblosen, leicht ablösaren Belag.</p>	<p>Strichkulturen ergeben einen sehr zarten Anflug, der anfangs aus ganz kleinen durchsichtigen, taurophenähnlichen Kolonien besteht, die später zu einem dünnen durchsichtig glänzenden Überzug zusammenfließen, wobei es jedoch nicht zur Schleimbildung kommt.</p>



## 10–20% Rohruckeragar.

Das Wachstum gibt dasselbe Bild wie auf Gelatine mit 20% Rohrucker.

Auf Strichkulturen gibt sich die Entwicklung des Bact. betae visc. zuerst durch reichliche den Strich entlang laufende Bildung von Schleim zu erkennen, der jedoch bald auf der Agaroberfläche sich ausbreitet und in dem unteren Teil des Röhrchens sich bis zu  $\frac{1}{2}$  cm hoher Schicht ansammelt. Nach einigen Tagen jedoch beginnt von unten aufsteigend eine Erweiterung und Verflüssigung des Agars, indem allmählich der Nährboden der ganzen Länge nach erweicht, und sich von der Wand des Röhrchens ablösend zu Boden fließt. Ein größerer Teil des Agars bleibt jedoch unverflüssigt. Besonders deutlich tritt diese Erscheinung bei Stichkulturen im Rohruckeragar auf.

## Milchkulturen.

In der Milch stellt sich 6 Tage nach der Impfung die Gerinnung ein.

## Kulturen auf Rüben und Kartoffeln.

Auf Kartoffeln entwickelt sich der *Micr. gelat.* gleichfalls langsam und bildet einen Koccus bedeutend schneller als auf Rüben.

Auf Kartoffeln bildet *Bact. betae visc.* eine schwache kaum wahrnehmbare Aufagerung, die



Streptococcus hornensis	Micrococcus gelatinogenus	Micrococcus gummosus	Bact. betae viscosum
<p>Die Optimumtemp. für das Gedeihen des Streptoc. horn. liegt zwischen 22—30° C. Bei 36° erfolgt zwar Wachstum, aber keine Dextranabscheidung. Auf 55° C erhitzt wird Strept. horn. nach 5 Minuten getötet. Dem Sauerstoff gegenüber verhält er sich wie ein fakultativ anaërober Mikroorganismus.</p>	<p>nen weißlichen, feuchten Belag.</p>	<p>und stärker als in Gelatine und Agar. Schon nach 24 Stunden ist auf Rüben ein feuchter Belag vorhanden. Nach 3 Tagen ist die Rübenscheibe fast auf der ganzen Oberfläche mit einer weißlichen, dickflüssigen Schicht bedeckt, woraus sich allmählich ein glatter, glänzender Überzug entwickelt, der sich über die ganze Rübenscheibe hinzieht und derselben das Aussehen gibt, als ob sie mit einer Syrupschicht überzogen wäre. Bei der Kartoffel ist das Wachstum dem auf der Rübe ähnlich, jedoch nicht so stark.</p>	<p>sich auf der Oberfläche weiter nicht ausbreitet. Eine Schleimbildung findet nicht statt. Auf roten Rüben bildet sich nach 2 Tagen ein glänzender, karminroter schleimiger Überzug, der sich auf der Oberfläche der Rübenscheibe ausbreitet und später auf den Boden des Kulturgläschens abfließt.</p>
<p><b>Verhalten gegen Temp. und Sauerstoffzutritt.</b></p>			
<p>Er wächst bei 20 - 25° C.</p> <p>Das Temperaturoptimum liegt zwischen 15—20° C. Der Kokkus wächst anaërob, ebenso wie aërob.</p> <p>Die Optimumtemp. liegt zwischen 17—20° C. Bei 30° C findet noch ziemlich gutes Wachstum statt, die Schleimbildung wird jedoch bedeutend schwächer. Bei 37° schwaches Wachstum, keine Schleimbildung. Bei 64° C stirbt er nach 5 Minuten ab. Ist fakultativ anaërob.</p>			



### Verhalten gegen Säure.

Wächst am besten auf alkalischen Nährböden. Schon bei schwachem Säuregehalt des Nährbodens (0.8 Tropfen reine Essigsäure auf 10 cm Nährge-latine) hört das Wachstum auf.

Wächst gut sowohl auf alkalischem, wie neutralem und mäßig saurem Nährboden. Das Wachstum wird erst bei 0.7% Milchsäure gehemmt.

### Chemische Leistungen.

In zuckerhaltigen Nährböden werden Säure und Gellatinoase gebildet. Die Säure besteht hauptsächlich aus Milchsäure. Daneben wurden auch Spuren von Essigsäure nachgewiesen.

Auf rohrzuckerhaltigen Nährböden bildet er Gummi (Dextran), Mannit, Milchsäure, Buttersäure und Kohlensäure. Essigsäurebildung konnte niemals nachgewiesen werden.

Auf allen zuckerhaltigen Nährböden werden Essig- und Milchsäure gebildet, jedoch bei Anwesenheit von Rohrzucker findet ausschließlich eine Produktion von Dextran und Mannit statt. Indol konnte nicht nachgewiesen werden, Gase kaum in Spuren. Die durchschnittlich höchste Azidität der Kulturen auf zuckerhaltigen Nährböden beträgt ungefähr 0.6% auf Milchsäure bezogen.

Auf zuckerhaltigen Nährböden bildet Streptococc. horn. erhebliche Mengen von Dextran, daneben Spuren von Gas und Säure.



häufig auch längere fadenförmige Formen an. Es zeigt ziemlich lebhaftige Eigenbewegung mittels einer am Ende befindlichen Geißel (gefärbt nach Loeffler). Sporen bildet es nicht, jedoch erhält es seine Lebensfähigkeit auf Nährböden ziemlich lange. Mit Anilinfarben färbt es sich gut, nach Gram wird es entfärbt. Das Bakt. wächst gleich gut bei Zimmertemperatur, wie bei 37° C, jedoch ist der Estergeruch bei letztgenannter Temperatur erheblich schwächer. Es ist relativ anaërob, wenn es sich schon in sauerstofffreier Atmosphäre nur schwach entwickelt.

**Gelatinkulturen.** Die Platten-Kolonien auf gewöhnlicher Gelatine zeigen schon nach 24 Stunden bei 22° C eine leichte schüsselförmige Einsenkung, die sich später allmählich vergrößert. Bei 150-facher Vergrößerung weisen die Kolonien in der Mitte eine körnige Masse manchmal mit strahliger Zeichnung auf, die von einem schmalen Hofe von aufgelöster Gelatine umgeben ist.

An der Gelatineoberfläche macht sich anfangs ein flacher weißlicher Anflug bemerkbar. Derselbe ist rundlich, scharfbegrenzt, matt glänzend u. vertieft sich bald infolge der Auflösung der Gelatine. Die Verflüssigung der letzteren erfolgt von der Oberfläche aus in schüsselförmiger Weise. Anfangs rasch, später immer langsamer in Walzenform breitet sich die Verflüssigung bei Gehalt von 10% Gelatine gewöhnlich nicht bis zum Boden des Probierglases aus. Nach einigen Tagen finden wir eine verflüssigte Säule, die von der festgebliebenen Gelatine durch eine weiße Schicht von Mikroorganismen abgegrenzt ist.

In der nicht gelösten Gelatine beobachten wir den Stichkanal entlang die Bakterienvegetation nach Art eines dicken Fadens, der am oberen gleichmäßigen Teile radial angeordnete Verzweigungen trägt, während der untere Teil perlschnurartige Unterbrechungen zeigt. Auf gewöhnlicher Gelatine erzeugen die Kolonien einen starken charakteristischen Estergeruch. Auf 2%iger Rohrzuckergelatine wächst das Bakterium in vollkommen analoger Weise, ohne jedoch den charakteristischen Estergeruch hervorzurufen.

Gewöhnliche Bouillon wird gleichmäßig getrübt, wobei sich nach einigen Tagen ein dünnes Häutchen auf der Oberfläche und ein reichlicher Niederschlag am Boden bildet; dabei entsteht ein starker Estergeruch, der sich ziemlich lange erhält.

Auf Zucker-Bouillon wächst das Bakterium in ähnlicher Weise, erzeugt jedoch keinen Geruch.



### Agarkulturen.

Auf gewöhnl. Agarplatten entstehen auf der Oberfläche weißliche gewölbte Kolonien mit feuchtem Glanze und von runder, gleichmäßig umgrenzter Form.

Bei 50-facher Vergröß. erscheinen dieselben gleichmäßig feinkörnig, schwachdurchscheinend ohne deutliche Zeichnung.

Die in der Tiefe gelegenen Kolonien sind gelbbraun, rund oder oval.

Strichkulturen. Den Strich entlang erscheint ein erhabener gelblich weißer Anflug, der sich schnell auf der Oberfläche ausbreitet, als saftreicher, feuchtglänzender Überzug. Nach etwa 2 Wochen nimmt der ganze Anflug gelbbraunen Farbenton an.

Das Kondensationswasser ist stark getrübt und nach einigen Tagen bildet sich ein reichlicher Bodensatz.

Stichkulturen. An der Einstichstelle erfolgt lebhaftige Vegetation; die Kultur bedeckt in kurzer Zeit die ganze Agaroberfläche mit einer 1 mm. dicken, feuchten, saftigen, anfangs gelblichweißen, später bräunlichen Schicht. Den Stichkanal entlang erscheint das Wachstum in Gestalt eines einheitlichen nach unten sich verschmälernden Fadens. Im oberen Teile desselben lassen sich jedoch oft feine strahlig angeordnete Ausläufer, besonders in alten Kulturen, beobachten.

### 2%iger Traubenzuckeragar.

Die Kultur unterscheidet sich nicht von der auf gewöhnlichem Agar gewachsenen.

### Milch.

Das Bakt. bringt Milch in 4 Tagen zur Gerinnung, wobei ein starker Estergeruch sich bemerkbar macht, der nach ca 14 Tagen einem unangenehmen Käsegeruch weicht.

Auf Kartoffeln bildet das Bakterium einen graugelben erhabenen Belag, der sich als feuchter, saftiger Überzug mit scharf begrenzten Rändern auf der Oberfläche ausbreitet, wobei die Färbung später in Dunkelbraun übergeht.

Auf Rüben-Nährböden entwickelt es sich gut, jedoch ohne besonders charakterisches Wachstum.

Zuckerhaltige Nährböden (Dextrose, Laktose, Maltose, Saccharose) bringt dieses esterbildende Bakterium zur Gärung, jedoch



ohne Gasentwicklung; dabei treten Milchsäure, Essigsäure und geringe Mengen von Buttersäure auf.

Einen höheren Säuregehalt verträgt das Bakterium jedoch nicht, daher steigt auch die Gesamtsäure auf zuckerhaltigen Nährböden kaum zu einer Höhe von 3·5—4 cem  $\frac{1}{10}$  n KOH im Verhältnis zu 20 cem Kultur an. Gasentwicklung findet nicht statt.

Indol wird weder in Bouillon noch in Gelatine gebildet.

#### Esterbildendes Bakterium Nr. II.

Unter dem Mikroskop erscheint es als kleine 0·6  $\mu$  dicke, 1·7 bis 2  $\mu$  lange Stäbchen, die häufig zu zweien, manchmal in kürzeren oder längeren Fäden angeordnet sind. Im hängenden Tropfen zeigen sie sehr lebhaftes Eigenbewegungen, die durch 2—4 gewöhnlich an einem, seltener (vor der Teilung) an beiden Enden sitzende Geißeln bewirkt wird. Anilinfarben nehmen diese Stäbchen gut auf, nach Gram entfärben sie sich. Sporenbildung findet nicht statt.

#### Kulturen auf gewöhnlicher Gelatine.

Platten. Schon 2 Tage nach der Aussaat erscheinen flache, gelbliche, matt durchscheinende Kolonien von 3 mm Durchmesser mit gezackten Rändern. Diese vergrößern sich allmählich auf der Oberfläche, wobei sie eine grünlichgelbe Farbe annehmen. Manchmal zeigt sich eine deutliche Zeichnung auf ihnen in Gestalt von Äderchen, die von der etwas vorgewölbten Mitte nach dem Rande zu verlaufen.

Im Umkreise der Kolonien wird die Gelatine lebhaft grünlich fluoreszierend. Bei 60-facher Vergröß. zeigen sie einen Bau und einen Zeichnungscharakter, welche den Kolonien von *Bact. coli* sehr ähnlich sind.

Das Aussehen der oberflächlichen Kolonien ist nämlich klein-körnig und manchmal mit kurzen, flachen Füßchen versehen. Die Ränder sind scharf begrenzt, gelappt; die Färbung ist blaßgelblich. Die tieferen Kolonien sind rundlich oder spindelförmig, von gelbbraunlicher Farbe.

Stichkulturen. An der Stichöffnung macht sich auf der Gelatineoberfläche ein lebhaftes Wachstum bemerkbar in Gestalt eines flachen ausgebreiteten Aufuges mit scharf begrenzten, lappigen Rändern.



Die Oberfläche des Belages ist in der Mitte glänzend, nach dem Rande zu irisierend. Den Impfkanaal entlang tritt nur sehr schwaches, kaum bemerkbares Wachstum auf.

Die Gelatinesäule zeigt im oberen Teile eine grünliche Fluoreszenz. Der Nährboden wird durch das Bakterium nicht aufgelöst,

Alle Gelatine-Kulturen zeichnen sich in den ersten Tagen durch angenehmen, kräftigen Obstgeruch aus, dem nach 4—5 Tagen der Geruch von von Trimethylamin folgt.

Strichkulturen auf schräger Gelatine ergeben einen flachen, fast die ganze Oberfläche überziehenden, feucht glänzenden Anflug von gelblichgrüner Farbe, während das Nährsubstrat stark fluoresziert.

#### Agarkulturen.

Die Kolonien auf Agarplatten unterscheiden sich von den ihnen ähnlichen auf Gelatine gezüchteten dadurch, daß sie mehr gewölbt sind, während die Lappenbildung der Ränder und der feuchtschleimige Glanz weniger hervortritt.

Strichkulturen. Den Impfstrich entlang entsteht ein üppiger, saftiger, weißlich durchscheinender Anflug von schleimigem Glanze, mit ungleichmäßigen, gleichsam zartgezähnten Rändern.

Stichkulturen. Auf der Agaroberfläche bildet sich eine mächtige Vegetation in Gestalt eines dichten gelblichgrünen Überzuges, der in kurzer Zeit sich über die ganze Oberfläche ausdehnt, als eine bis 2 mm. hohe Schicht.

Den Impfkanaal entlang zeigt sich nur eine schwache fadenförmige Entwicklung.

Auf Zucker sowie auf Glycerin-Agar wächst das Bakterium ebenso wie auf gewöhnlichem Agar, nur etwas weniger mächtig und mit schwächerer Esterbildung.

Auf gewöhnlicher Bouillon, die sich bei Temperatur von 18—20° C nach 3 Tagen gleichmäßig und stark trübt, entsteht ein dünnes Häutchen auf der Oberfläche, das erst nach längerer Zeit als kompakter Bodensatz nach unten sinkt.

Die Bouillon zeigt in der ganzen Schicht eine grünliche Fluoreszenz und sendet einen charakteristischen Obstgeruch aus, während die Reaktion aus der neutralen in die alkalische übergeht. In älteren Kulturen lassen sich Spuren von Indol nachweisen.

Auf Zuckerbouillon wächst dieses esterbildende Bakterium



ebenso wie ohne Zuckerzusatz, wobei es weder Gas noch Säuren entwickelt; deshalb bringt es auch Milch nicht zur Gerinnung.

Auf Milch gezüchtet erzeugt es einen starken lange anhaltenden Estergeruch. Charakteristisch ist sein Verhalten auf Lackmuserum. In der Zeit von 48 h entsteht auf dieser Nährflüssigkeit ein Häutchen, wobei sich die Flüssigkeit infolge des Umschlages der Reaktion bläut. Nach einigen Tagen entfärbt sich die Flüssigkeit in den tieferen Schichten infolge der Reduktion des Farbstoffes vollständig; beim Umschütteln nimmt sie jedoch wieder die blaue Farbe an.

Auf Kartoffeln zeigt das Bakterium ein üppiges Wachstum, wobei es einen leicht erhabenen graugelblichen, schleimig-glänzenden, saftigen Überzug bildet, der die ganze Oberfläche bedeckt.

Auf roten Rüben entwickelt es sich ähnlich, aber weniger ausgiebig; auf diesen beiden letzteren Nährböden entsteht jedoch nur ein schwacher Geruch.

Auf Rübenextrakt wächst es ziemlich gut, ähnlich wie auf Bouillon, sofern die Reaktion des Nährsubstrates nicht sauer ist, da schon bei schwacher Azidität kein Wachstum erfolgt. Die günstigste Temperatur für das Bakterium liegt zwischen 18—20° C; bei 37° C erlischt sein Wachstum vollständig. Dieses esterbildende Bakt. Nr. II ist wahrscheinlich identisch mit dem von Maassen isolierten, leider nicht näher beschriebenen, *Bacillus estrificans fluorescens*<sup>1)</sup>.

---

Aus dem bei 25° vergährten Rübenaufguß züchtete ich, wie bereits oben bemerkt wurde, außer den beschriebenen Mikroorganismen noch drei Arten von Stäbchen, die ich hier in Kürze charakterisieren will, zwar nicht aus dem Grunde, weil sie etwa eine besondere Rolle bei der Barszcz-Gährung spielen, da ein guter Barszcz nicht bei höherer Temper. als 22° C bereitet wird, sondern deshalb, weil Epstein jener Art der Mikroorganismen die Gährung der roten Rübenaufgusses zuschreibt.

Alle diese drei Stäbchen sind in der Tat Säurebildner, die die

<sup>1)</sup> Maassen, Arb. aus d. Kais. G. Amte, Bd. XVII 1898, Trächätherbildende Bakterien.



Milchgährung des Zuckers bewirken, jedoch unfähig sind, die dem Barszcz eigentümliche Gährung herbeizuführen.

#### Stäbchen von Typus $\alpha$

Auf gewöhnlicher Gelatine bildet das Bakterium sehr kleine stecknadelkopfgroe Kolonien, die den Nährboden nicht auflösen; auf Zucker und Rübengelatine fallen die Kolonien etwas größer aus. Unter dem Mikroskope erscheinen sie als kurze kokkenahnliche zu zweien, oder in kurze Ketten angeordnete Stäbchen, die sich stark nach Gram färben. Im hängenden Tropfen zeigen sie keine Bewegung. Zuckernahrboden vergähren sie. Das Verhalten dieses Stäbchens entspricht vollständig den Eigenschaften des Guntherschen Bakteriums auf sämtlichen Nährsubstanzen mit Ausnahme von Milch; diese wird nämlich durch frische Kulturen erst kaum nach zwei Wochen zur Gerinnung gebracht, während längere Zeit ubergeimpfte Kulturen diese Fähigkeit überhaupt einbüßen.

Wir dürften es also in diesem Falle wahrscheinlich mit einer Abart des Guntherschen Bakteriums zu tun haben, welche Wehmer u. später Butjagin aus Sauerkraut isolierten.

#### Stäbchen vom Typus $\beta$ .

Dieses wurde nur einmal gefunden; es erscheint unter dem Mikroskop in der charakteristischen Gestalt von dicken, kurzen Stäbchen, die jedoch manchmal als längere vereinzelt, oder in Ketten liegende Fäden auftreten. Im hängenden Tropfen zeigt dieses Bakterium lebhaftere Eigenbewegung. Nach Gram wird es entfärbt. Auf gewöhnlicher Gelatine bildet es gewölbte, rundliche, weiße, saftige Kolonien von 1–2 mm. Durchmesser, die den Nährboden nicht auflösen. Milch wird weder bei Zimmerwärme noch bei Temp. über 25<sup>o</sup> C zur Gerinnung gebracht.

#### Stäbchen vom Typus $\gamma$ .

Dieses ruft auf gewöhnlicher Gelatine große, flache, matt durchscheinende Kolonien von 3 mm Durchmesser, die ein glasiges Aussehen besitzen, hervor. Unter dem Mikroskop erblicken wir kurze, schlanke Stäbchen neben längeren Fäden. Nach Gram entfärbt sich das Bakterium. Im hängenden Tropfen zeigt es lebhaftere Eigenbewegung. Zuckerhaltige Nährböden bringt es zur Gährung. Milch



gerinnt unter seinem Einfluß sowohl bei Zimmerwärme, wie bei Temper. von über 25° C in 4—6 Tagen. Lackmuserum wird gerötet und später in den tieferen Schichten entfärbt.

### Chemische Untersuchung.

Zur qualitativen Untersuchung verwandte ich ausschließlich Proben von Barszcz eigener Erzeugung, wobei ich die schon anfangs beschriebenen Bereitungsvorschriften genau einhielt.

Aus den Gährungsprodukten trachtete ich vor Allem die organischen Säuren auszuscheiden. Dazu wurden 2 Liter Sauerbrühe durch kohlen-saures Natron neutralisiert und bis zur Syrupkonsistenz eingedampft. Nach Versetzung mit konz. Phosphorsäure wurde die Mischung mit Wasserdampf abdestilliert, bis die übergebende Flüssigkeit keine saure Reaktion mehr aufwies. Den Destillations-Rückstand stellte ich zur weiteren Untersuchung bei Seite. Das mit Natronlauge neutralisierte Destillat wurde bis zur Syrupkonsistenz eingedampft, nochmals mit Phosphorsäure versetzt und von neuem überdestilliert.

Das zuletzt erhaltene Destillat roch stark nach Essigsäure und gab nach der Neutralisation mit Soda mit neutralem Eisenchlorid dunkelrote Färbung und beim Erwärmen einen rostbraunen Niederschlag des basischen Salzes. Beim Erhitzen mit Alkohol und konz. Schwefelsäure trat der charakteristische Geruch nach Essigäther, sowie auch beim Erwärmen mit trockenem essigsauerm Natron und arseniger Säure der Geruch nach Kakodyl auf. Dagegen gab das Destillat nach Neutralisation mit Ammoniak und Erwärmen mit Silbernitrat gar keine Reduktion, was das Nichtvorhandensein von Ameisensäure bewies. Die Prüfung auf Buttersäure sowohl durch Sättigung der Lösung mit Chlorcalcium, sowie durch Erwärmen mit Alkohol und Schwefelsäure (Fehlen des charakteristischen Geruches von Buthyläther) fiel negativ aus. Das alleinige Vorhandensein der Essigsäure im Destillate bewies auch schließlich die Analyse des Silbersalzes. Ein Teil des Destillats wurde mit Sodalösung neutralisiert, die Lösung zweimal auskrystallisiert und sodann mit Silbernitrat gefällt. Das gründlich ausgewaschene, aus heißer Lösung umkrystallisierte und im Vacuum getrocknete Silber-salz wurde zur Analyse benützt:



0.5086 Substanz gab nach dem Glühen: 0.3262 Ag, demnach für  $C_2H_3O_2$  Ag

Gef.	Ber.
Ag 64.13%	64.67%

Von flüchtigen Fettsäuren wurde also im Barszcz nur Essigsäure aufgefunden.

Der nach Entfernung der flüchtigen Säuren verbliebene Rückstand wurde im Schwartz'schen-Apparat mit Äther durch einige Tage erschöpft. Nach Verflüchtigung des Äthers verblieb eine syrupartige, gelblich gefärbte und stark sauer reagierende Flüssigkeit, die nach Verdünnung mit Wasser sehr deutlich die Uffelmannsche Reaktion ergab.

Die wässrige Lösung wurde mit Zinkkarbonat neutralisiert, filtriert, das Filtrat durch Tierkohle entfärbt und schließlich bis auf ein kleines Volumen eingedampft und zur Krystallisation überlassen. Beim Abkühlen der Flüssigkeit schieden sich bald in reichlicher Menge Krystalle aus, welche unter dem Mikroskope die charakteristischen Formen des Zinklaktates zeigten. In dem wiederholt umkrystallisierten Salze wurde die Krystallwasser- und Zinkbestimmung vorgenommen:

0.4782 g. Substanz ergaben nach dem Trocknen bis zum konstantem Gewicht bei  $100^\circ$  0.3916 gr.

d. i. für  $(C_3H_5O_3)_2Zn + 3H_2O$  (optisch inaktives Zinklaktat):

Gef.	Ber.
$H_2O$ 18.10%	18.17%

Bei der Zinkbestimmung ergaben 0.3916 gr. auf obige Art ausgetrockneten Salzes nach dem Glühen 0.1310  $ZnO$ .

d. i. für  $(C_3H_5O_3)_2Zn$

Gef.	Ber.
Zn 26.8%	26.9%

Die isolierte Säure war daher zweifellos optisch inaktive Milchsäure. Zur weiteren Ausscheidung der Gährungsprodukte wurden im Vakuum 2 Liter Barszcz bis auf den achten Teil der verwendeten Menge eingedampft und mit 97% Alkohol gefällt, wobei der letztere unter stetem Umrühren eingegossen wurde. Hierbei schied sich ein reichlicher Niederschlag aus, welcher sich zu gummi-



artiger Masse zusammenballte und an dem Glasstabe haften blieb. Diese Masse wurde bei weiterem Alkoholzusatz immer härter und bildete am Boden des Gefäßes einen formlosen, noch etwas plastischen Klumpen. Nach dem Abgießen des Alkohols wurde er in Wasser aufgelöst, wobei man eine trübe, rötliche, stark schleimige Flüssigkeit erhielt.

Trotz wiederholter Auflösung und Fällung mit Alkohol enthielt diese Substanz dennoch stets Beimengungen von Mineralsalzen, sowie Stickstoffverbindungen und Farbstoff. Behufs weiterer Reinigung wurde die Masse in mit verdünnter Salzsäure angesäuertem Wasser aufgelöst und die Lösung durch 2 Stunden bei etwa 45° C erwärmt. Nach entsprechender Verdünnung erhielt man eine Flüssigkeit, die nicht mehr fadenziehend war. Dieselbe wurde nach Entfärbung mit Tierkohle durch Porzellanfilter abgesaugt. Das Filtrat war farblos, durchsichtig und nur in dicker Schicht kaum etwas opalisierend. Nach der Neutralisation mit Kalilauge wurde es bis auf ein kleines Volumen eingedampft und mit der 6-fachen Menge Alkohol gefällt. Auf diese Weise erhielt man einen kleinflockigen, vollkommen weißen, noch etwas an den Wänden des Becherglases haftenden Niederschlag, der auf Büchner'schem Filter gesammelt und gründlich mit 70% Alkohol gewaschen wurde.

Nach wiederholter Lösung und Alkoholfällung der mit Salzsäure angesäuerten Flüssigkeit stellte der schließlich erhaltene Niederschlag nach gründlichem Auswachsen und Trocknen weiße Klümpehen dar, die Ähnlichkeit mit Dextrin hatten und sich leicht pulverisieren ließen. Der Körper enthielt nunmehr keine Stickstoffverbindungen, ließ jedoch nach dem Verbrennen immer noch eine geringe Menge Asche zurück, welche ich auch bei erneuter Reinigung ohne allzu bedeutende Materialverluste nicht hatte entfernen können.

Der erhaltene Körper löst sich ziemlich langsam in Wasser, leichter bei Zusatz von Salzsäure, schwieriger in Gegenwart von Alkali. In reiner Lösung zeigt er neutrale Reaktion und faden Geschmack. Er wird bei mäßiger Konzentration durch Bleiessig, Kupferhydratlösung, sowie auch durch Gerbsäure gefällt; polarisiertes Licht dreht er stark nach rechts. Fehling'sche Lösung reduziert er nicht direkt, nach dem Kochen mit Salzsäure erfolgt jedoch deutliche Reduktion. Der durch Hydrolyse entstandene Körper dreht ebenfalls die Polarisationsenebene nach rechts und bildet mit Phenylhydrazinazetat charakteristische Krystalle von Phenylgluko-



sazon, mit einem Schmelzpunkte bei 204°C. Die beschriebenen Eigenschaften bestätigen in vollem Maße, daß dieser aus Barszcz isolierte Körper mit dem sogenannten Dextran identisch ist, welchen man öfters bei der schleimigen Gährung des Rohrzuckers findet.

Nach der Fällung des Dextrans wurde die verbliebene alkoholische Flüssigkeit filtriert und mit  $\frac{1}{3}$  Volumen äthyläther versetzt. Die anfangs stark getrübe Flüssigkeit schied beim Absetzen reichliche Menge eines krystallinischen Niederschlages am Boden und an den Wänden des Gefäßes aus. Dieser, auf einem Büchner'schen Filter gesammelt, stellte nadelförmige, weiße, seidengänzende Kryställchen, von leichter Rosafärbung dar. Nach wiederholtem Umkrystallisieren aus heißer alkoholischer Lösung ließen sich ohne Mühe Kryställchen von glänzend weißer Farbe erhalten, welche beim Verbrennen keine Asche ergaben.

Dieser Körper reduziert die Fehling'sche Lösung weder direkt, noch beim Erwärmen mit verdünnter Salzsäure. Nach längerem Kochen mit Fehling'scher Lösung und nach mehrstündigem Stehen scheidet sich eine unbedeutende Menge von Kupferoxydul ab. Er gibt auch gar keine anderen, den Zuckerarten eigenen Reaktionen, trotzdem er einen deutlich süßen Geschmack besitzt. Die reine Lösung dieses Körpers ist optisch inaktiv, bei Versetzung mit Borax jedoch dreht sie die Polarisationsebene nach rechts. Der Schmelzpunkt betrug 163–164°C (uncorr.).

Auf Grund der beschriebenen Eigenschaften, sowie des gefundenen Schmelzpunktes, konnte man diesen Körper als Mannit ansprechen, was auch die unten angegebenen Analysen bestätigen:

0.1856 gr. Substanz ergaben beim Verbrennen  $\text{CO}_2 = 0.2662$ ,  
 $\text{H}_2\text{O} = 0.1231$ .

Für  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$ :

Gefunden	Berechnet:
C — 39.11%	C — 39.56%
H — 7.43%	H — 7.69%
O — 53.46% (diff.)	O — 52.75%

Mannit findet sich im Barszcz in verhältnismäßig großer Menge. Aus 2 Litern erhielt ich über 12 gr. ziemlich reiner Substanz.

Da weder Mannit noch Dextran im Rotrübenauszug vorkommen, muß man annehmen, daß ihre Anwesenheit im Barszcz aus der Gährung resultiert.



Zucker konnte im fertigen Barszcz nicht nachgewiesen werden. Die Reduktion der Fehling'schen Lösung, die derselbe nach dem Kochen mit verdünnter Salzsäure hervorruft muß auf die Anwesenheit des Dextrans bezogen werden, da nach dessen Beseitigung mit Hilfe des Alkohols und nach Entfernung des letzteren die Kupferlösung gar nicht reduziert wird.

Es ist überflüssig hervorzuheben, daß ich bei Analyse der Gährungsprodukte mich nicht nur auf eine einzelne Probe beschränkte, sondern daß ich Sauerbrühen verschiedener Provenienz in Untersuchung nahm.

Behufs genauer Erkennung der Zusammensetzung von Barszcz stellte ich außerdem eine ganze Reihe von quantitativen Bestimmungen an. Dabei wurde berücksichtigt: Spez. Gewicht, die Azidität, Trockenrückstand, Asche, Gehalt an Essigsäure und Milchsäure, Gesamtstickstoff, sowie Eiweißkörper, Dextran und Gesamtphosphor.

Die Gesamtazidität bestimmte ich durch Titration mit  $\frac{1}{10}$  n-KOH, wobei Lackmus als Indikator diente. Es ließ sich übrigens die Endreaktion im Barszcz leicht erkennen, da bei der Neutralisation die ursprüngliche rote Farbe einen violetten Anflug annimmt.

Der Trockenrückstand wurde durch Abdampfen von 10—20 cm Flüssigkeit auf dem Wasserbade und durch Trocknen bei  $105^{\circ}\text{C}$  bis zum konstanten Gewicht bestimmt, die Asche durch vorsichtiges Verbrennen festgestellt. Zur Bestimmung der Essigsäure wurde 50 cm<sup>3</sup> Sauerbrühe im Wasserdampfstrom bis zum Übergang aller flüchtigen Säure destilliert und die Azidität des Destillats mit  $\frac{1}{10}$  n-Kalilauge titriert.

Der Milchsäuregehalt wurde im Ätherauszug ermittelt, den ich mit Hilfe des Schwartz'schen Apparates entweder unmittelbar aus der Sauerbrühe (nach Zugabe der Phosphorsäure), oder aus dem Destillationsrückstand erhielt; im ersten Falle wurde natürlich der der Essigsäure zukommende Anteil von der Gesamtazidität abgezogen.

Des Gesamtstickstoff wurde unter Anwendung der gewöhnl. Kjeldal'schen Methode gefunden. (Indikator Rosolsäure; Titrieren mit  $\frac{1}{10}$  n KOH).

Den Dextran bestimmte ich ebenfalls von der Ansicht ausgehend, daß bei dem Mangel einer genaueren Methode, eine wenn auch nur annähernde Bestimmung wünschenswert erschiene. Es



wurden dazu 100 cm<sup>3</sup> Sauerbrühe mit Kalilauge neutralisiert, auf ein Volumen von 30—40 cm<sup>3</sup> eingedampft und mit der mehrfachen Menge von 97% Alkohol gefällt. Der auf einem Büchner'schen Filter abgesaugte und genügend ausgewaschene Niederschlag wurde in einer kleinen Menge lauen Wassers aufgelöst und wiederholt mit starkem Alkohol gefällt. Der auf dem Filter gesammelte Niederschlag wurde wiederum in Wasser aufgelöst, die Lösung eingedampft und der Rückstand bei 105° C bis zum konst. Gewicht getrocknet gewogen (A), dann verbrannt und auch das Gewicht der Asche festgestellt (B).

Die vereinten alkoholischen Filtrate wurden abgedampft und der Gehalt an Stickstoff bestimmt. Aus der Differenz des Gesamtstickstoffs im Barszcz konnte die Stickstoffmenge, die im Dextraniederschlag als Eiweißstoffe beigemischt war (multipliziert mit Koeff. 6.25 = C) berechnet werden. Nach Abzug der Asche und der Eiweißstoffe vom Gewicht des ganzen getrockneten Niederschlages [A — (B + C)] ergab sich beiläufig das Gewicht des Dextrans. Die Eiweißstoffe wurden nach Stutzer bestimmt.

Der Gesamtphosphor wurde nach der üblichen Methode durch Schmelzen des Trockenrückstandes von 100 cm<sup>3</sup> Barszcz mit Soda und Salpeter, Auflösung der Schmelze in salpetersäurehaltigem Wasser, Fällung mit Molybdänammonium und Wägung als Magnesiumpyrophosphat bestimmt.

Die Analyse von 5 Barszcz-Proben von verschiedener Provenienz ergab folgende Resultate:

Siehe Tafel Seite 48.

Wie ersichtlich variiert die Zusammensetzung des Barszcz, was die Azidität anbelangt, nur in engen Grenzen, dagegen kommen größere Differenzen im Gehalt von Dextran und Stickstoffverbindungen vor. Diese Differenzen hängen vor Allem von der Zusammensetzung der roten Rüben ab.

Die Dextranmenge steht in einem einfachen Verhältnis zum Zuckergehalt der roten Rüben, wenn auch der Einfluß der Temperatur, bei welcher die Gärung vor sich geht, hierbei eine nicht untergeordnete Rolle spielt. Hoher Zuckergehalt der Rübenmazerate und verhältnismäßig niedrige Zimmertemperatur (17—18° C) sind vorteilhaft für die Bildung größerer Dextranmengen im Barszcz.

Der Vollständigkeit halber wurde auch zweimal die bei Ver-



Barszcz	I.	II.	III.	IV.	V.
Beschaffenheit	stark schleimig	stark schleimig	viscos	viscos	viscos
Sp. Gew. b. 16°C . . . .	1·1708	1·0170	1·0160	1·0139	1·0156
Enthält in 1000 cm <sup>3</sup> Flüssigkeit					
Trockenrückstand . . . .	44·780	40·200	36·540	35·060	36·430
Asche . . . . .	3·847	3·391	2·402	3·380	3·930
Gesamtazidität (in 1 L. auf Milchsäure berechnet) .	6·624	6·570	5·868	6·156	5·868
Essigsäure . . . . .	2·016	1·704	2·100	2·064	1·896
Milchsäure . . . . .	3·546	4·320	3·494	3·492	3·367
Gesamtstickstoff . . . . .	0·714	0·708	0·462	0·425	0·446
Eiweißstoffe . . . . .	2·520	1·411	1·004	0·587	0·573
Dextran . . . . .	15·102	13·730	4·353	5·336	7·522
Gesamtphosphor ber. als P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0·312	0·360	0·387	0·311	0·247

brennung des Trockenrückstandes der Barszcz-Proben zurückgebliebene Asche analysiert.

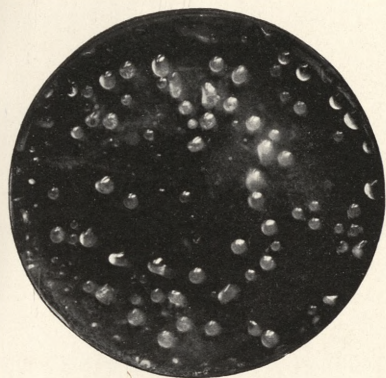
Die Asche von einem Liter Barszcz enthält:

	K <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> O	CaO	MgO	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	SO <sub>3</sub>	Cl	SiO <sub>2</sub>
I.	1·573	0·239	0·0255	0·1174	0·0038	0·1740	0·0653	0·3784	0·0096
II.	1·361	0·558	0·0310	0·0769	0·0012	0·1440	0·0655		0·0062

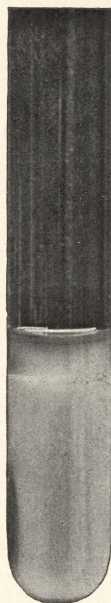
Die Zusammenfassung der angeführten Untersuchungsergebnisse führt zu folgenden Schlüssen:

1. Die Barszcz-Gärung ist eine schleimige Gärung, welche durch einen spezifischen Mikroorganismus (*Bacterium betae viscosum*) in der Mazerationsflüssigkeit der roten Rüben bei Temp. von 18—20° C verursacht wird.

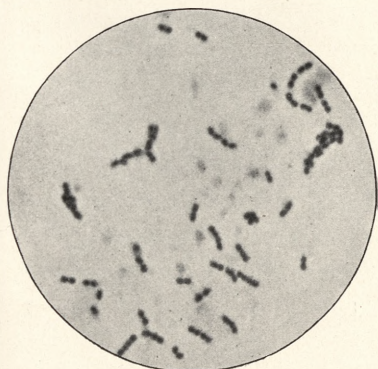




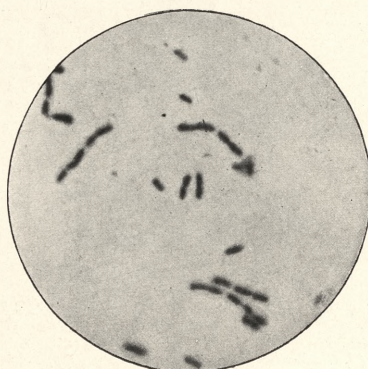
A.



B.



C.

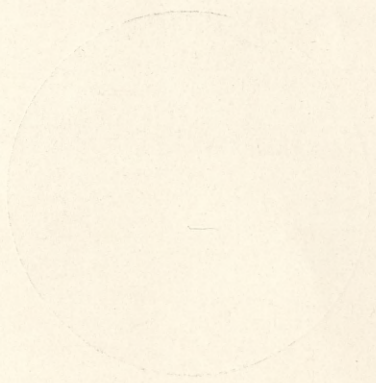


D.

K. Panek.

Druk. Unio. Jagiell. w Krakowie.







2. Diese Gährung erfolgt auf Kosten des in den roten Rüben enthaltenen Rohrzuckers; ihre Produkte sind außer Dextran, welcher dem Barszcz die Dickflüssigkeit resp. Viscosität verleiht, Mannit, ferner Essig- und Milchsäure.

3. Bei höherer Temperatur als 25° C unterliegt der Rüben-aufgu der Milchgährung, die ihn zwar sauer macht, ohne jedoch einen guten Barszcz zu erzeugen.

4. Schließlich nehmen im Anfange des Gahrungsprozesses auch esterbildende Bakterien teil, welchen der Barszcz seinen eigentümlichen, angenehmen Geruch verdankt.

Lemberg im Januar 1905.

Hygienisches Institut der Universität.

#### Erläuterung der Tafel.

- A. *Bact. betae viscosum*. Plattenkultur auf Rübensaftgelatine. 8 Tage alt.  
 B. *Bact. betae viscosum*. Stichkultur in Zuckeragar (mit 10% Saccharose).  
 C. *Bact. betae viscosum*. Reinkultur auf schrägem 2% Dextrose-Agar. Ausstrichpreparat.  
 D. *Bact. betae viscosum*. Ausstrichpreparat aus „Barszcz“. (C. u. D. Reichert Oc. Nr. III. Hornog. Immers.  $\frac{1}{18}$  Ap. 1:25).

4. Mme M. KRAHEL'SKA. **Zapłodnienie odłatków jaj jeźowców i pierwsze okresy ich podziału.** (*Sur le développement mérogonique des oeufs du Psammechinus*). Mémoire présenté par M. C. Kostanecki m. t.

(Planches II, III, IV).

#### Introduction.

Dans la littérature scientifique, le problème du développement mérogonique a été pose pour la première fois par Rostafiński en 1877<sup>1)</sup>. Mais le travail de Rostafiński, publie en polonais, est reste presque inconnu. C'est aux Hertwig que l'opinion courante attribue la première observation sur le développement des fragments<sup>2)</sup>. En effet, O. et R. Hertwig les premiers ont attiré l'attention sur le fait que le développement peut se produire aussi bien dans les fragments

<sup>1)</sup> „*Dividua ovi natura*“, Acad. d. Sciences à Cracovie.

<sup>2)</sup> „*Ueber die Befrucht. u. Theilungsvorgang d. tierischen Eies unter dem Einfluss usserer Agentien*“ 1887.



nucléés que dans les fragments anucléés. Boveri s'est occupé d'une façon plus spéciale de la question du développement des fragments anucléés<sup>1)</sup>. Il appuie sur l'importance qu'a, pour la théorie de l'hérédité, l'observation des embryons issus des fragments anucléés fécondés, car ces embryons n'ont alors dans leur développement que la chromatine d'origine paternelle. Boveri a démontré que chez les larves, obtenues de ces fragments fécondés par des spermatozoïdes d'une espèce étrangère, on ne retrouve que les caractères paternels et il y voit une preuve de la théorie, qui attribue la transmission des caractères héréditaires exclusivement à la substance nucléaire.

En même temps que Boveri, Seeliger<sup>2)</sup> et Morgan<sup>3)</sup> se sont occupés du développement mérogonique. Seeliger se borne surtout à la polémique avec Boveri en ce qui concerne ses conclusions sur la théorie de l'hérédité. D'après les observations de Morgan le développement des fragments se ferait plus lentement que le développement normal et il ne se produirait que dans des cas relativement peu nombreux. Dans les figures karyokinétiques, pendant la segmentation, se répète constamment le nombre dédoublé des chromosomes: démonstration de thèse de l'individualité des chromosomes.

Le champ d'expériences sur la mérogonie a été étendu par Delage<sup>4)</sup> qui a observé non seulement le développement des fragments d'oeufs des oursins (dont on se servait jusqu'alors exclusivement comme d'objet d'études), mais aussi celui des mollusques (*Dentalium*) et des vers (*Lancia cochlygea*). Delage dans ses travaux insiste sur l'importance des études du développement mérogonique pour la théorie de la fécondation en général. La constatation du développement et de la fécondation des fragments anucléés nous prouve l'activité du cytoplasme ovulaire.

Les fragments provenant des oeufs non mûrs, ne subissent pas la fécondation. Ainsi donc le processus de la maturation comprend non seulement les noyaux, mais aussi le cytoplasme des oeufs. Le

<sup>1)</sup> „Ein geschlechtlich erzeugter Organismus ohne mütterl. Eigenschaften“ 1889, „Ueber die Befruchtung u. Entwicklungsfähigkeit kernloser Seeigel-Eier“ 1896.

<sup>2)</sup> „Giebt es geschlechtl. erzeugte Organismen ohne mütterl. Eigenschaften“ 1895.

<sup>3)</sup> „The fertilisation of non nucleated fragments of echinoderm eggs“ 1895.

<sup>4)</sup> „Embryons sans noyau maternel“ 1898, „Etudes sur la mérogonie“ 1899, „Etudes sur la maturation cytoplasmique“ 1901.



fait que les fragments se laissent féconder aussi difficilement que les oeufs entiers par les spermatozoïdes d'une espèce étrangère, montre que la propriété immunisante doit être inhérente au cytoplasme.

Delage rejette la thèse de l'individualité des chromosomes. D'après lui, les larves mérogoniques contiennent dans les figures karyokinétiques de leurs cellules, le nombre normal des chromosomes réglé par la faculté autorégulatrice de l'oeuf. Le développement mérogonique se ferait d'ailleurs, d'après ses expériences, d'une manière normale, sans différence in minus dans le temps.

C'est aussi l'avis de Wilson<sup>1)</sup> quia observé le développement des fragments des oeufs du *Cerebratulus marginatus*. La période pendant laquelle on pourrait obtenir des fragments fécondables et aptes à poursuivre leur développement durerait, d'après lui, depuis la cessation du processus de la maturation jusqu'au moment de la fécondation des oeufs entiers.

La mérogonie a été étudiée ensuite par Giard<sup>2)</sup>, Rawitz, Ariola et Winkler<sup>3)</sup>; les trois premiers se sont servis pour leurs observations des oeufs des oursins. Le dernier a observé le développement mérogonique des oeufs d'un végétal (*Cystosira barbata*).

En général dans tous les travaux cités ici, le développement mérogonique a été observé principalement dans ses manifestations extérieures. Dans ces expériences, il s'agissait surtout — d'une part de s'assurer si réellement les fragments, surtout les fragments anucléés, pouvaient être fécondés et se développer d'une façon normale — d'autre part d'obtenir dans le développement mérogonique les stades les plus avancés qu'il soit possible. L'évolution interne du processus de la fécondation et du développement initial mérogonique n'a pas été étudiée de plus près.

#### Méthodes.

Pendant le semestre d'été 1904 j'ai fait, dans le laboratoire de l'Institut d'Anatomie descriptive, des expériences sur le développement mérogonique. Comme objet d'études, j'employais les oeufs de l'oursin *Psammachinus* (*Echinus microtuberculatus*).

1) „Experiments on escavage and localisation in the nemertine egg.“ 1901

2) „Pour l'histoire de la mérogonie“ 1901, „Sur le développement parthéno-génétique de la Microgamète de métozoaires“ 1899.

3) „Ueber Merogonie und Befruchtung“ 1901.



Les fragments, obtenus par le secouage et fécondés immédiatement après, étaient cultivés soit dans l'eau de mer naturelle, envoyée avec les animaux de la station zoologique de Trieste, soit dans l'eau de mer artificielle. Cette dernière était préparée d'après la formule donnée par Herbst dans son dernier travail.

Dans les deux expériences où la culture était faite dans la solution de Herbst, j'ai obtenu des phases du développement plus avancées que dans le cas où j'employais l'eau de mer naturelle. Les oeufs non fragmentés ont atteint dans l'eau de mer artificielle le stade de pluteus, tandis que les oeufs qui étaient cultivés dans l'eau de mer naturelle n'ont pas atteint le stade de blastula nageante.

Il faut expliquer cette différence dans le développement par ce que l'eau de mer a dû être souillée par les animaux pendant le transport. L'application de l'eau artificielle rend donc possible de faire des expériences, même dans les instituts situés loin de la mer.

J'observais la marche du développement d'une part *in vivo*, en transportant toutes les 15 minutes quelques-uns des fragments sur un verre de montre pour les étudier au microscope, d'autre part sur les coupes. Pour la fixation, je me suis servie du liquide de Perenyi. Après le passage dans les alcools, l'alcool absolu et le xylol, — les oeufs étaient inclus à la paraffine.

Les coupes de 5—10  $\mu$  d'épaisseur, ont été colorées à l'hématoxyline à l'alun de fer de Heidenhain, combinée avec le bordeaux  $\beta$ , ou à l'hématoxyline de Delafield avec l'éosine.

Pour compléter les résultats de mes expériences, j'ai profité des préparations des phases du développement mérogonique des oeufs de l'oursin *Strongylocentrotus lividus*, faites par le Dr. E. Godlewski à Naples. Les fig. 2 et 15 représentent les fragments des oeufs de *Strongylocentrotus*.

#### Arrondissement des fragments.

Les fragments obtenus par voie de secouage, ont présenté, immédiatement après la cessation du secouage, des formes très variées. Si les oeufs employés pour les expériences étaient sains, la plupart des fragments étaient de forme ovale, ou ellipsoïdale.

Mais si l'on observait pendant quelque temps un de ces fragments fortement allongés, on pouvait remarquer que, déjà au bout de 10—15 minutes, son aspect extérieur avait changé d'une façon manifeste, et tendait, en s'arrondissant graduellement, à reconstituer



la forme sphérique propre aux oeufs entiers. Au bout de 25—30 minutes, les fragments dans lesquels ce processus s'était manifesté, avaient déjà la forme sphérique complètement reconstituée.

Les esquisses qui suivent représentent le processus d'arrondissement, observé dans deux fragments dans quelques phases successives de leur évolution.

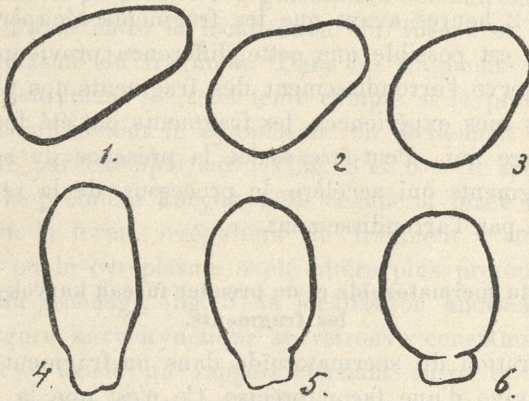


Fig. 1.

Les Nr. 1, 2 et 3, premier fragment, étaient dessinés dans les intervalles de 5 minutes, le Nr. 1 ayant été fait 10 minutes après la fécondation. L'arrondissement y évoluait d'une façon normale. Au bout de 20 minutes ce fragment avait pris une forme presque complètement sphérique. Les Nr. 4, 5 et 6 se rapportent à un cas un peu différent. Ici une partie seulement du cytoplasme du fragment, prend part au processus de l'arrondissement; l'autre partie, relativement insignifiante paraît rester inactive et à la fin de ce processus, elle se trouve située en dehors de la périphérie du fragment arrondi.

Des fragments pareils donnent des images qui rappellent celles de la segmentation irrégulière. Cependant le fait qu'on peut les observer déjà 20 à 30 minutes après la fécondation, nous démontre qu'il ne s'agit pas d'une segmentation irrégulière. Selon la règle, la segmentation se produit beaucoup plus tard. De même, il ne peut y être question de la décomposition dégénérative du cytoplasme du fragment, car, des deux parties, celle qui s'arrondit se développe ensuite presque constamment d'une façon normale. Ce n'est que la partie plus petite qui dégénère.



Les observations faites au cours de toutes mes expériences, confirment le fait que la segmentation normale ne se produit que dans les fragments qui se sont arrondis auparavant. Si la segmentation a lieu même dans les fragments allongés, elle est presque constamment irrégulière.

Dans mes expériences l'arrondissement se produisait 20 à 30 minutes après la cessation du secouage. D'après Boveri il s'écoulerait près de 2 heures avant que les fragments récupèrent la forme sphérique. Il est possible que cette différence provienne de ce que Boveri a observé l'arrondissement des fragments non fécondés, tandis que dans mes expériences, les fragments ont été fécondés aussitôt le secouage fini. Peut-être est-ce la présence du spermatozoïde dans les fragments qui accélère le processus de la régulation, qui se manifeste par l'arrondissement.

#### Localisation du spermatozoïde et du premier fuseau karyokynétique dans les fragments.

La pénétration du spermatozoïde dans un fragment ne peut être observée *in vivo* d'une façon précise. Ce n'est que la formation de la radiation qui nous montre que le fragment donné a été fécondé. Il semble que les spermatozoïdes ne pénètrent pas dans les fragments très petits. Les plus petits fragments dans lesquels j'ai vu se former la radiation, pouvaient avoir à peu près  $\frac{1}{20}$  de volume de l'oeuf entier.

Il a été confirmé plus d'une fois que les spermatozoïdes pénètrent dans les fragments nucléés et anucléés. Cependant on manque de données précises sur la localisation des spermatozoïdes dans les fragments, surtout dans les fragments anucléés, de même que sur les changements ultérieurs qu'ils y subissent. Et, au point de vue de la biologie, cette question mérite bien d'attirer l'attention, car dans les fragments anucléés, l'attraction chimiotactique de la part des substances nucléaires ne peut pas entrer en jeu, comme on pourrait l'admettre d'après les expériences de Pfeffer. Si donc le mouvement du spermatozoïde s'y produit, il doit être considéré comme un mouvement spontané, ou assujéti à l'action de certaines forces dans les limites du cytoplasme femelle. Je n'ai que peu de préparations de fragments des oeufs du *Psammechinus* fixés aussitôt après la fécondation, c'est-à-dire dans la période de la marche du spermatozoïde.



Sur deux préparations seulement, j'ai vu nettement la tête du spermatozoïde. Dans ces deux cas elle était située presque tout à fait à la périphérie, précédée par le spermatozoïde avec sa radiation; donc la rotation a été déjà faite.

Nous pouvons juger de la marche du spermatozoïde d'après la localisation de la première karyokynèse. Les coupes des fragments dans la période de la première segmentation démontrent l'existence d'un rapport intime entre la localisation du fuseau et la forme et l'état du cytoplasme du fragment. Dans les fragments qui se sont arrondis antérieurement — sans tenir compte si le processus de la régulation a compris tout le cytoplasme ou seulement une de ses parties, comme par exemple sur les fig. 3 et 6 — le spermatozoïde, ou plus tard la première karyokynèse occupe la place normale, au centre. Là, où la forme irrégulière du fragment a été conservée (fig. 4) ou là où le cytoplasme a été altéré plus profondément par le processus du secouage, (fig. 5) la localisation anormale, périphérique de la figure karyokynétique se retrouve constamment.

Ainsi donc il existe un rapport constant entre la forme d'un oeuf et la localisation du spermatozoïde dans cet oeuf. Ce fait paraît plaider pour que la marche du spermatozoïde dans un oeuf ne soit pas un mouvement spontané, mais qu'elle soit soumise — plus ou moins à l'action de certaines forces dans les limites du cytoplasme ovulaire. La radiation qui se forme autour du spermocentre est une manifestation externe de l'action de ces forces. Si nous admettons avec Wilson, Ziegler et ensuite Vejdowsky et Mrazek que la radiation dans un oeuf fécondé soit exclusivement une manifestation du mouvement des molécules cytoplasmiques, le rapport constant qui existe entre l'état du cytoplasme des fragments et la localisation du spermatozoïde — ou de la figure karyokynétique — deviendra clair pour nous.

Ce spermatozoïde exerce une action de nature chimique sur le cytoplasme ovulaire. Là où ce protoplasme a été altéré plus profondément pendant le secouage, la réponse au stimulus, donnée par le spermatozoïde ne peut se manifester avec la même intensité. S'il se produit même dans le protoplasme, un mouvement se traduisant à l'extérieur par l'arrangement radié des granulations dentoplasmiques, il est trop faible pour pouvoir créer la disposition symétrique du cytoplasme autour du noyau mâle ou du spermocentre. Le mouvement, provoqué dans le cytoplasme par le spermatozoïde, coopère



peut-être avec le processus autorégulateur de l'arrondissement, en tendant aussi à la reconstitution des rapports normaux, c'est-à-dire au groupement uniforme du cytoplasme autour du noyau, situé au centre. L'un et l'autre de ces deux processus dépendra exclusivement de l'état de l'activité du cytoplasme. Le noyau ou le centre mâle sera situé, à la périphérie là où, à cause de l'altération plus profonde du cytoplasme la régénération de la forme spécifique n'a pas pu s'accomplir et où une radiation plus accentuée ne s'est pas développée.

#### La segmentation.

Dans mes expériences, la segmentation des fragments se passait, en général, d'une façon très inégale à partir des premiers stades du développement. Les cas de segmentation normale n'ont pu être observés que dans les fragments qui se sont arrondis auparavant.

Les données suivantes qui concernent les temps du développement des fragments sont extraites exclusivement des observations faites sur le processus de la segmentation normale des fragments.

29/IV les oeufs entiers, non secoués	la fécondation était faite	la première seg- mentation ap- paraît dans	la seconde seg- mentation
	1 h. 30 m.	2 h.	2 h. 35 m.
19/V les fragments . .	11 h. 30 m.	1 h. 45 m.	2 h. 05 m.
3/V " " . .	11 h. 50 m.	1 h. 35 m.	1 h. 45 m.
2/V " " . .	5 h. 20 m.	1 h. 40 m.	1 h. 45 m.
2/V " " . .	4 h.	1 h. 47 m.	1 h. 50 m.
6/X " " . .	10 h. 57 m.	1 h. 45 m.	2 h.
19/V les oeufs entiers secoués	11 h. 30 m.	1 h. 15 m.	1 h. 30 m.

Sans tenir compte de quelques oscillations insignifiantes, on pourrait conclure du tableau ci-dessus que le développement mérogonique se passe d'une façon plus énergique que le développement normal. Cependant cette accélération des temps peut être observée non seulement pour les fragments, mais aussi — et d'une façon plus nette encore — pour les oeufs entiers qui ont subi le secouage sans se fragmenter. Ainsi donc la différence dans les temps entre le dé-



veloppement mérogonique et le développement normal, paraît pouvoir être attribuée uniquement à l'influence exercée par le secouage mécanique. Naturellement, un secouage trop fort ne pourra provoquer une accélération dans le temps du développement.

Pour illustrer la segmentation normale dans les fragments, je donne quelques figures des premiers stades du développement. Les figures 3, 4 et 5 proviennent de la période de métaphase de la première division. Les fuseaux ont sur les pôles les centrosomes, que l'on peut voir bien nettement sur les fig. 3 et 4. Les radiations sont partout fortement développées. Dans les plans équatoriaux des fuseaux on voit les chromosomes de la couronne équatoriale (étoile-mère), après la scission longitudinale (fig. 3 et 4), dans le passage à anaphase, sur la fig. 5. La fig. 3 nous montre un fragment dans lequel du cytoplasme altéré et déformé par le secouage, s'est différencié une partie de plasmé sain, en formant une cellule normale sphérique.

On voit un cas analogue sur la fig. 6: une partie de cytoplasme qui n'a pas pris part au processus régulateur de la forme, ne prend aucune part au développement. Dans la partie arrondie, la segmentation se trouve déjà dans le stade d'anaphase. A cause d'une coloration inexacte, les centrosomes avec leurs radiations n'y sont pas bien visibles,

Les figures B, 7 et 8 représentent les phases successives de la période de la deuxième segmentation: le passage des noyaux-filles en état de peloton (spirème) (13) et les couronnes équatoriales, étoiles-mères, (8) de la deuxième karyokynèse. Dans ces cas les fragments se développent d'une manière normale. Les centrosomes s'y dessinent nettement.

En ce qui concerne la formation de la couche hyaline externe (Ziegler) que l'on voit constamment apparaître presque immédiatement après la fécondation autour des oeufs entiers (comme nous le pouvons observer sur la fig. Nr. 1), les fragments se comportent d'une manière extrêmement variable.

Parmi les fragments qui se développent normalement, on peut en trouver une quantité assez notable qui sont entourés d'une couche hyaline (fig. 7, 8). Il est cependant difficile d'admettre que la couche hyaloplasmique joue dans le mécanisme de la division le rôle que lui attribue Ziegler, en présence de ce fait que les fragments qui en sont dépourvus complètement peuvent se développer d'une façon normale (fig. 13).



En général là où toutes les altérations possibles, produites dans la structure intime du cytoplasme par le processus de secouage, ont été réparées ensuite par l'action régulatrice du cytoplasme, le développement des fragments ne diffère guère du développement normal des oeufs entiers, du moins dans les premières périodes. La seule différence entre la segmentation des oeufs entiers, normalement fécondés, et celle des fragments anucléés consiste dans ce que dans ces derniers, les anses chromatiques dans les figures karyokynétiques sont moins nombreuses.

Comme quantité normale de chromosomes pour les cellules du *Psammechinus Boveri* donne 18, Morgan 24, Stievens 36 chromosomes. La numération des anses chromatiques au cours des segmentations des oeufs entiers et des fragments nucléés plus grands me permet d'admettre d'une manière décisive que la quantité normale de chromosomes y est au moins supérieure à 20. Les fragments représentés sur les fig. 3, 4, 5, 6 et 8 sont donc incontestablement des fragments anucléés: le nombre de chromosomes y oscille entre 9 et 12.

Ce nombre 9—12 se répète ultérieurement au cours de la deuxième et de la troisième segmentation. L'observation des premières divisions dans les fragments anucléés paraît donc confirmer l'existence d'une individualité des chromosomes.

Je ne veux pas préjuger si la reconstitution, admise par Delage, du nombre normal des chromosomes dans les cellules des embryons mérogoniques se produit en général, ou non. Mais je peux pourtant affirmer sans restriction que d'après mes observations, elle ne se produit pas dans les premiers stades du développement. Cela s'accorde d'ailleurs avec le fait sur lequel Morgan et Boveri (02, p. 72), ont attiré déjà l'attention et qui a été tout dernièrement démontré par Petrunkevitch. Ses observations sur le développement parthénogénétique montrent que jusqu'au stade de morula, la régénération de chromosomes ne se produit pas dans les oeufs de *strongylocentrotus*.

#### Segmentations irrégulières.

Parmi les très nombreuses images de la segmentation anormale dans les fragments, on a pu distinguer deux types principaux d'anomalies. Les unes consistent en ce que le développement ne comprend qu'une partie du fragment, l'autre partie ne subissant pas la



segmentation; dans les autres, la segmentation se produit tout d'un coup dans quelques cellules, à cette segmentation se joint l'inégalité et la disposition variée des blastomères formés.

Les esquisses ci-jointes, faites sur des objets vivants, représentent quelques formes de l'anomalie de développement qui consiste dans ce qu'une partie du fragment reste passive, quoiqu'elle ne se décompose pas.

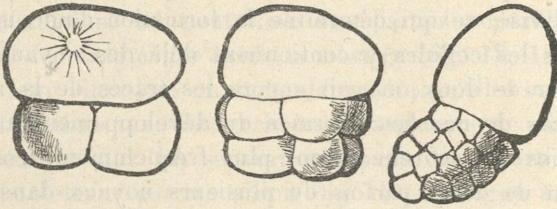


fig. 2.

Le processus de la segmentation y ressemble morphologiquement à celui qu'a provoqué artificiellement Ziegler en empêchant le fusionnement des deux pronucléus. Il a divisé l'oeuf fécondé par un étranglement artificiel, en 2 parties unies par un mince passage protoplasmique: dans l'une se trouvait le pronucléus femelle, dans l'autre le spermatozoïde. On pouvait observer constamment la segmentation normale dans la partie où se trouvait le spermatozoïde; l'autre partie ne se divisait pas, bien qu'elle ne se décomposât pas pendant longtemps.

L'état anormal du plasme dans les fragments peut, en diminuant l'activité du cytoplasme, rendre impossible le fusionnement des deux pronucléus. Alors cette partie du cytoplasme qui est groupée autour du pronucléus mâle et de son centrosome (spermocentre) se développe plus ou moins normalement; l'autre partie, sans prendre part dans le développement, reste en apparence liée en quelque sorte à la partie active et, probablement grâce à la présence du noyau, peut pendant longtemps (comme nous le voyons sur les esquisses) résister à la dégénérescence.

La segmentation en quelques cellules inégales tout d'un coup, est d'habitude, comme l'a déjà montré Boveri l'effet d'une surfécondation (polyspermie). Si plusieurs spermatozoïdes pénètrent dans un oeuf ou dans un fragment et si chacun d'eux se développe séparément, en formant une figure mitotique normale, bipolaire (fig. 11),



la segmentation peut évoluer d'une manière normale. Elle devient d'habitude anormale si la polyspermie amène la formation d'une figure karyokynétique multipolaire avec la répartition inégale des chromosomes.

On peut voir sur la fig. 10 une segmentation de cette sorte en trois cellules en même temps, provoquée probablement par ce que de deux spermocentres dans le fragment fécondé par deux spermatozoïdes (dispermie), l'un a subi la segmentation et l'autre est resté non divisé, ce qui détermine la formation d'une mitose tripolaire. Toutes les cellules y contiennent déjà des noyaux en état de repos; autour de deux on voit encore les traces de la radiation.

En dehors de ces deux formes du développement anormal, une des anomalies qui se rencontrent plus fréquemment, consiste dans la formation de deux, parfois de plusieurs noyaux dans les limites du cytoplasme non divisé du fragment (fig. 9). On n'ignore pas que sous l'effet de diverses influences nocives pour le cytoplasme (température, action des substances chimiques dans le milieu ambiant, insuffisance d'oxygène) apparaissent des images de la division du noyau sans la division du plasmé. De même ici, à cause de l'altération mécanique du cytoplasme, la division du noyau peut se produire sans la division du cytoplasme, et amener la formation d'une cellule à plusieurs noyaux.

En général cependant, malgré les nombreuses irrégularités dans le développement, je n'ai pas rencontré les anomalies spéciales que l'on pourrait considérer comme caractéristiques pour le développement mérogonique. Comme facteur principal, provoquant de fréquentes anomalies de développement, il faut considérer l'altération du cytoplasme des oeufs pendant le secouage et non l'absence de pronucléus femelle.

#### Autotomie.

En décrivant le processus de l'arrondissement des fragments, j'ai remarqué qu'il peut ne pas comprendre la totalité du cytoplasme. Une petite partie du plasmé ne prend aucune part dans le processus de la régulation de la forme; quand celui-ci est fini, elle reste en dehors de la cellule arrondie et elle subit assez rapidement la dégénérescence graduelle.

Ces particules plasmatiques, exclues de processus de dévelop-



pement ne peuvent pas être considérées comme des extraovats. Immédiatement après le secouage, autour de nombreux oeufs, on peut voir des extraovats plus ou moins grands. Ils sont produits par le processus même du secouage, mécaniquement, tandis que ici la séparation d'une partie de cytoplasme ne se montre que quelque temps après la cessation du secouage et évolue d'une façon graduelle simultanément avec l'arrondissement de la partie restante de cytoplasme de fragment. Sur les coupes des fragments fixés 1 heure  $\frac{1}{2}$  après la fécondation, on peut voir ces parties séparées du cytoplasme dans des fragments assez nombreux (fig. 12, 13, 14).

D'après leur situation, on voit clairement qu'elles ont formé primitivement un tout avec le territoire cytoplasmique où se fait le développement normal. La séparation de ces deux parties peut être faite tout simplement par un sillon (fig. 13), analogue à celui de la segmentation cellulaire, ou bien par une couche hyaloplasmique différenciée (fig. 12).

Sur les fig. 12, 13 (ainsi que sur les figures 3 et 6) dans le plasmé situé en dehors du territoire où se fait le développement, on ne voit pas une trace de chromatine. Le plasmé des parties séparées a constamment un aspect anormal, il s'y montre souvent une vacuolisation et son contour est d'habitude nettement irrégulier.

La dégénérescence doit arriver assez promptement: sur les préparations colorées des stades postérieurs au stade de quatre blastomères, je n'ai vu nulle part ces segments de plasmé à côté des fragments qui se développaient. Une question se pose, comment doit-on expliquer ce phénomène qu'une partie de cytoplasme ne prenne aucune part au développement. Si ce fait se produisait exclusivement dans les fragments anucléés et s'il était lié toujours à l'absence absolue de chromatine dans la partie séparée, on pourrait, en analysant ce processus, partir de la proposition qu'une condition nécessaire de développement soit un rapport quantitatif constant entre la masse de cytoplasme et la somme de substances du noyau.

D'après les données de R. Hertwig le rapport quantitatif entre le cytoplasme et le noyau ne peut varier, dans chaque cellule vivante que dans certaines limites. La cellule meurt ou passe dans un état anormal si ce rapport est détruit. Dans certains cas de fécondation mérogonique, nous avons affaire à des fragments dans lesquels la quantité de cytoplasme dépasse la moitié de la quantité totale de cytoplasme d'un oeuf entier, — et le fragment malgré cela



ne contient pas le noyau. On peut alors admettre que le rapport normal entre le noyau et le cytoplasme est détruit au profit de celui-ci. On serait autorisé à conclure que ce fragment s'efforce de reconstituer les rapports normaux par élimination d'une partie de plasmе.

On ne pourrait admettre une explication pareille que, si les cas de séparation d'une partie de plasmе se montraient seulement dans les fragments anucléés, et encore si ces fragments avaient une grandeur déterminée. Mais comme le phénomène décrit ci-dessus peut être observé aussi bien dans les fragments anucléés que dans ceux qui contiennent le pronucléus femelle, comme il se montre d'autre part dans les œufs entiers dans lesquels le cytoplasme a été altéré plus profondément par le secouage, — une explication de ce genre doit être absolument rejetée.

L'élimination d'une partie de cytoplasme du processus de développement dépend exclusivement de l'état du plasmе; de même que le processus de l'arrondissement, elle est une réaction de la part du protoplasme vivant contre l'altération provoquée dans sa structure par le secouage. La cause de l'élimination d'une partie de cytoplasme du processus de développement peut consister dans ce que pendant la fragmentation une seule partie de cytoplasme était altérée plus fortement.

On rencontre souvent dans les organismes supérieurs une réaction semblable contre les lésions externes. Elle consiste dans l'élimination de la partie lésée. Nous avons toute une catégorie de phénomènes analogues, compris sous le nom d'autotomie. Dans un fragment fécondé, la séparation d'une partie de cytoplasme altéré par le secouage, la séparation qui est liée au mouvement actif du reste de cytoplasme, nous donne un exemple de l'autotomie dans une cellule.

Le phénomène d'autotomie cellulaire que je décris, est analogue en quelque sorte à celui qu'a observé Jennings (04) chez une amibe. Après avoir lésé par une action mécanique une partie de cet organisme unicellulaire, il a vu que cette partie avait été séparée par l'animal même du reste du corps cellulaire et qu'elle subissait la dégénérescence complète.

La définition de l'autotomie, donnée par E. Godlewski<sup>1)</sup> corres-

<sup>1)</sup> „... die Autotomie ist als Reaktion von Seiten des übrigen Teils des Or-



pond exactement à l'évolution du phénomène d'autotomie dans les fragments. L'altération du cytoplasme par le secouage ou encore la dégénérescence partielle du plasmé dans un territoire plus profondément altéré, y constitue le facteur libérateur. La séparation de la partie altérée est une réaction de la part du reste du cytoplasme sain contre les changements qui sont produits dans cette partie.

Une question se présente: Comment peut s'accomplir cette séparation de la partie altérée? Le processus d'autotomie est-il une action de la totalité du cytoplasme ou seulement une manifestation de la contraction d'une partie du cytoplasme, attendant au segment autotomisé? Il est impossible de le déterminer d'une manière décisive. Le rapport qui existe entre l'arrondissement du fragment et la séparation d'une partie de son cytoplasme, nous permet plutôt de supposer que l'activité de la totalité du cytoplasme y entre en jeu: un mouvement qui consiste dans un déplacement des molécules cytoplasmiques.

Autour de la partie séparée par autotomie, on peut encore observer parfois (fig. 12) les traces de la couche hyaloplasmique. Il paraît donc probable que la formation de cette couche précède dans le temps, la séparation du cytoplasme altéré et incapable de se développer. Ce n'est que dans l'évolution ultérieure du processus autorégulateur que le fragment fécondé peut accomplir l'autotomie, grâce au mouvement actif du plasmé.

La fig. 14 représente un cas un peu différent. Le pronucléus femelle y est situé dans la partie du protoplasme qui ne se développe pas. La seule différence entre le plasmé de cette partie et le reste du plasmé du fragment, consiste dans leur réaction différente sur les colorants plasmatiques. En apparence, on pourrait croire que l'on a affaire plutôt aux deux blastomères inégaux dont les noyaux se trouvent dans les phases différentes de la deuxième karyokynèse. Qu'il n'en est pas ainsi, cela est prouvé par la coloration différente de ces deux parties et aussi par ce que cette coupe provient d'un fragment fixé avant le passage de la première segmentation. La karyokynèse qu'on y voit est la karyokynèse du spermatozoïde. Le pronucléus femelle avec une partie de cytoplasme ne prend aucune part au développement. On voit probablement sur cette figure,

ganismus auf die Änderung des normalen Zustandes der Nachbarschaft zu betrachten“.

Tier-Kenntniss d. Regulationsvorg. b. Tubularia mecembryanthemia, p. 156.



en coupe, un exemple de ce développement partiel, dont les phases ultérieures, étudiées *in vivo* se trouvent dans mes esquisses Nr. II. Pareillement à ce qu'a observé Ziegler dans les expériences déjà citées, ici se montre autour du pronucléus femelle une faible radiation, qui prouve l'existence d'un centrosome femelle (ovocentre). Cette forme de développement partiel constitue un cas spécial de l'autotomie, où la partie autotomisée, grâce à la présence du noyau, peut pendant très longtemps résister à la dégénérescence.

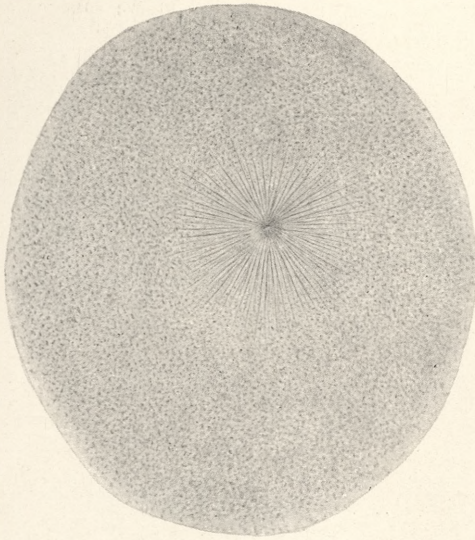
Les phénomènes du développement des fragments présentés par nous, semblent démontrer que les oeufs mûrs ont en général une structure interne caractéristique. Cette structure constitue le point de départ pour le processus de développement. De sa conservation donc dépend la possibilité du développement.

L'existence dans l'oeuf d'une structure définie a été soulevée plus d'une fois déjà par les savants qui ont étudié la fécondation. Rostafinski qui le premier a observé la fécondation et le développement mérogonique attire l'attention sur ce fait que la condition de développement des fragments consiste dans la conservation de l'arrangement du cytoplasme propre aux oeufs entiers. Dans les oeufs de *Fucus vesiculosus*, sur lesquels il a fait des expériences, il distingue trois couches cytoplasmiques, disposées concentriquement. Les fragments seuls dans lesquels on pouvait prouver l'existence de toutes les trois couches protoplasmiques, ont germé.

En 1897 Driesch, d'après ses expériences sur les oeufs des oursins, a acquis la certitude que la plupart des oeufs possèdent une organisation déterminée, préformée. Boveri dans ses expériences sur les oeufs du *Strongylocentrotus lividus* a montré l'existence d'une structure stratifiée. En ce qui concerne la mérogonie, il dit aussi que le développement d'un fragment donné est assujéti d'une façon constante à la présence, dans ce fragment, de toutes les couches plasmatiques de l'oeuf entier.

Il existe donc dans un oeuf un arrangement spécifique du cytoplasme qui est détruit par le secouage. Afin que le développement puisse se produire d'une façon normale, le cytoplasme dans le fragment ou dans l'oeuf secoué doit présenter les rapports normaux primitifs. C'est dans ce but que se produit l'action régulatrice: la disposition symétrique des molécules plasmatiques autour du noyau





1.



2.



3.

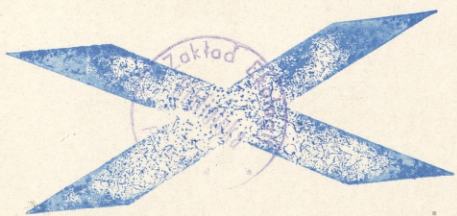


5.

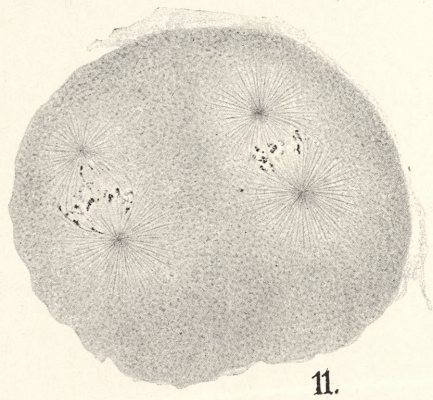
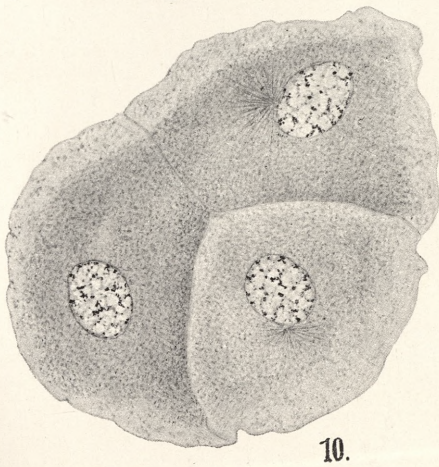
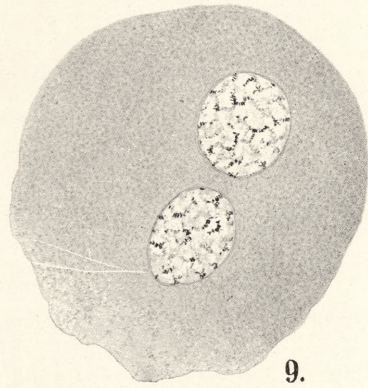
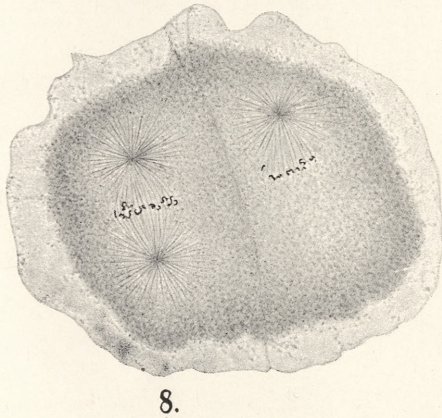
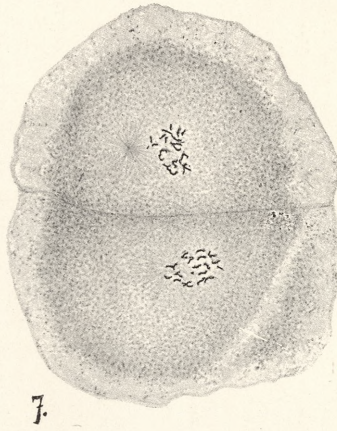


4.





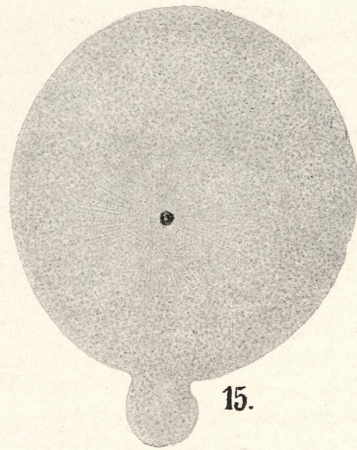
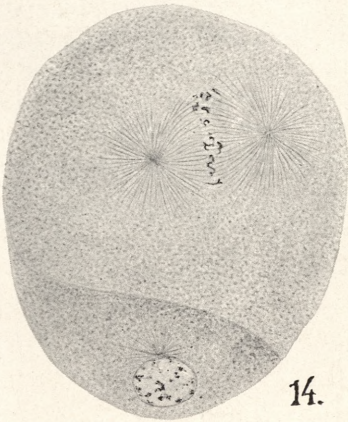
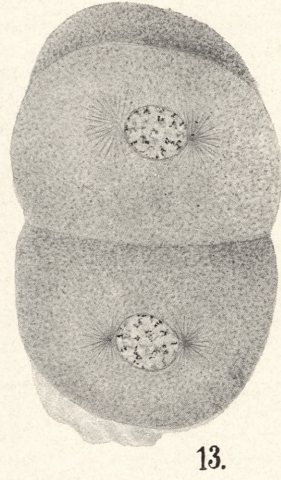


















du spermatozoïde, ou respectivement autour de la figure mitotique. Cette action ne peut se produire que si le plasme n'a pas trop souffert pendant le secouage. Si tout le plasme d'un fragment a été altéré trop profondément, le fragment ne récupère pas la forme sphérique et la figure karyokynétique y est située à la périphérie. Si une partie du cytoplasme a été altérée plus profondément d'une manière spéciale, il se produit l'autotomie de la partie altérée par l'action du reste de cytoplasme.

Ainsi donc l'arrondissement des fragments et la localisation centrale de la figure mitotique, de même que l'autotomie, sont des manifestations des facultés autorégulatrices du cytoplasme ovulaire qui tend, après la déformation qu'il a subie pendant le secouage, à la reconstitution des rapports normaux.

### Les figures.

**Nr. 1.** L'oeuf entier du *Psammechinus* fécondé d'une manière normale.

**Nr. 2.** La fécondation d'un fragment anucléé d'un oeuf du *Strongylocentrotus*. La tête du spermatozoïde se trouve dans le stade de la prophase.

**Nr. 3.** La karyokynèse dans le stade d'étoile-mère dans un fragment anucléé. Une grande partie du cytoplasme ne prend aucune part dans le développement.

**Nr. 4 et 5.** La localisation anormale, périphérique, de la figure karyokynétique dans les fragments. Sur la fig. 4 on voit une étoile-mère, sur la fig. 5 la karyokynèse se trouve dans le passage à l'anaphase.

**Nr. 6.** Le stade de l'anaphase dans un fragment. Comme sur la fig. 3 la régulation et le développement n'ont compris qu'une partie de cytoplasme, l'autre partie, plus grande, se trouve en dégénérescence.

**Nr. 7 et 8.** Deux phases successives de la période de la seconde karyokynèse. Le développement s'y passe d'une manière normale.

**Nr. 9.** Une forme du développement anormal. La formation de deux noyaux dans un fragment non divisé.

**Nr. 10.** Une segmentation irrégulière en trois cellules à la fois, provoquée par la dispermie.

**Nr. 11.** Un autre cas de dispermie. Chaque spermatozoïde se développe séparément.

**Nr. 12 et 13.** Les parties séparées (autotomisées) du cytoplasme, à côté d'un fragment dans la période de la première karyokynèse (fig. 12), divisé en 2 blastomères (fig. 13).

**Nr. 14.** Un cas d'autotomie où dans la partie séparée du plasme se trouvent le pronucléus femelle et l'ovocentre.

**Nr. 15.** Le fragment d'un oeuf du *Strongylocentrotus* avec un extraovot à la périphérie (fixé 10 cm. après la fécondation).

Les fig. 3 à 14 représentent les fragments des oeufs du *Psammechinus*.



5. MM. ANNA DRZEWINA et AUG. PETTIT. O hyperplazyi tkankowej, wywołanej przez usunięcie śledziony u Ichthyopsidae. (*Sur des hyperplasies tissulaires consécutives à l'ablation de la rate chez les Ichthyopsidés*). Mémoire présenté par M. M. Siedlecki m. c.

Dans l'embranchement des Vertébrés, les appareils lymphoïdes présentent un perfectionnement organique sensiblement parallèle au développement phylogénétique, et, à ce point de vue spécial, on peut distinguer deux grands groupes caractérisés par la présence (Mammifères et Oiseaux) ou l'absence (tous les autres Vertébrés<sup>1</sup>) de ganglions lymphatiques.

Mais il est à noter, qu'en revanche, ces derniers animaux offrent fréquemment l'exemple de localisations lymphoïdes affectant les organes les plus divers (cerveau, coeur, foie, intestin, oesophage, rein), et constituant même, chez certains types, de véritables appareils anatomiques; cette évolution est, d'ailleurs, insensible, et on peut trouver dans la série zoologique tous les stades intermédiaires entre les simples amas de cellules lymphatiques et les organes les plus perfectionnés.

L'étude de la structure histologique des organes lymphoïdes des Ichthyopsidés nous a conduits à étudier leur rôle et à examiner les corrélations, qui, chez quelques Vertébrés inférieurs, particulièrement favorables à ce point de vue, en raison de l'absence plus ou moins complète de moelle osseuse unissent, entre elles la rate et certaines des localisations lymphoïdes sus-indiquées. Pour mettre en évidence le rôle leucopoiétique des organes lymphoïdes, nous avons choisi, pour des raisons de commodité expérimentale, l'Anguille (*Anguilla anguilla* L) et la Roussette (*Scyllium canicula* Cuv.), dont le rein chez celle-ci, l'oesophage chez celle-là, renferment une proportion notable de tissu lymphoïde; chez ce dernier animal même la masse renfermée dans la portion initiale du tube digestif cesse d'être un amas diffus, pour se transformer en un véritable organe<sup>2</sup>).

Sur plusieurs exemplaires de ces deux espèces de poissons, nous

<sup>1</sup>) A l'exception peut-être des Crocodiliens. Owen a, en effet, signalé chez le *Crocodylus acutus*, Cuv. la présence d'un ganglion lymphatique(?) mésentérique. *Proceedings of Zool. Society*. vol. I 1831.

<sup>2</sup>) A. Drzewina. Sur l'organe lymphoïde de l'oesophage des Sélaciens. C. R. de la Soc. de Biologie. 1904. p. 637.



avons enlevé la rate avec les précautions habituelles d'asepsie; <sup>1)</sup> cette opération a été en général bien supportée; les animaux ont été sacrifiés en état de bonne santé apparente du 4-e au 13-e jour et leurs tissus étudiés au point de vue histologique comparativement avec des témoins. Consécutivement à la splénectomie, dans les cas suivis d'une survie suffisamment prolongée, on constate une prolifération réactionnelle constante <sup>2)</sup>, soit du tissu lymphoïde rénal, soit de l'organe lymphoïde de l'oesophage, caractérisée par divers processus <sup>3)</sup>, dont le plus manifeste consiste dans l'augmentation très sensible du nombre des karyokinèses des éléments lymphoïdes <sup>4)</sup>.

D'autre part, les mononucléaires sont le siège d'une évolution que nous nous bornerons à signaler ici sommairement. Sur les coupes fixées au liquide de Zenker iodé et colorées à l'éosine-orange-bleu de toluidine, le cytoplasme de certains de ces éléments cesse d'être basophile et s'imprègne d'une substance dont les réactions vis-à-vis de l'orange présentent les plus grandes analogies avec celles de l'hémoglobine. Cette variation des affinités chromatiques coïncide avec une modification du cytoplasme et du noyau qui finissent par revêtir les apparences des mêmes formations des hématies.

L'hyperplasie compensatrice qui, consécutivement à la splénectomie, frappe soit le tissu lymphoïde rénal de l'Anguille, soit l'organe oesophagien du Scyllium, constitue la preuve des corrélations fonctionnelles qui unissent la rate et certaines des formations lymphoïdes qui existent chez les Ichthyopsidés.

<sup>1)</sup> Pour l'immobilisation des Sélaciens, voir le contentif, qui est décrit p. 627 par A. Pettit. C. R. de la Soc. de Biologie, 1904.

<sup>2)</sup> Pour le détail des observations et des expériences ainsi que pour les figures et la bibliographie, voir la thèse que A. Drzewina soumettra prochainement à la Faculté des Sciences de Paris.

<sup>3)</sup> Pour les modifications concomitantes du sang, voir: A. Pettit, Bulletin du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris, en 1904.

<sup>4)</sup> Chez le Triton splénectomisé, J. Jolly n'a pas constaté d'hyperplasie de la couche corticale du foie (Arch. d'Anat. microscop. t. VI. 1904.



