

[Aus dem hygienischen Institut der Universität Tomsk.]

Über die keimtötende und entwicklungshemmende Wirkung von Hühnereiweiß.

Von

P. Laschtschenko,
Professor der Hygiene an der Universität zu Tomsk.

Unter den vielen Nährböden zur Kultur von Mikroorganismen sind auch Hühnereier in rohem und gekochtem Zustande vorgeschlagen worden. Diesen Vorschlag machte, wie bekannt, zuerst Hueppe (1). Günther (2), Zörkendörfer (3) arbeiteten alsdann besondere Methoden aus, um die Eier besser zu oben genannten Zwecken verwenden zu können, und in allen Lehrbüchern der Bakteriologie findet man bald kürzere, bald ausführlichere Bemerkungen über die Züchtung von Mikroorganismen im Innern von Hühnereiern.

Außerdem existieren noch viele Arbeiten über die Fähigkeit einiger pathogener Bakterien (Cholera, Typhus, Dysenterie), durch eine unversehrte Eierschale in das Innere des Eies einzudringen und sich dort zu vermehren, eine Frage, die ja in epidemiologischer Beziehung einige Bedeutung hat, wenn man, wie es in diesen Arbeiten geschieht, die Tauglichkeit des Eies als Nährboden für die genannten pathogenen Mikroorganismen voraussetzt [Hammerl (4), Abel u. Draeer (5), Piorkowsky (6), Hueppe u. Tajan (7), Zenthöffer (8), Lange (9), Sachs-Mücke (10), Bonhoff (11) u. a.] In bezug auf Choleravibrionen verzeichnen einige Autoren entweder die Steigerung der Virulenz (Wilm (12) u. a.) oder das Hervortreten neuer biologischer Eigenschaften (Bildung von SH_2) bei ihrem Wuchse im Hühnerei (Kemper (13), Zenthöffer u. a.).

Mit diesen Ergebnissen schienen mir einige Beobachtungen, die ich an rohem, ungeimpftem Eiweiß und Eigelb machte, nicht recht im Einklang zu stehen, und regten mich an, die Wirkung des Hühnereies auf verschiedene Bakterien und seine Verwendbarkeit als Nährboden genauer zu prüfen.

Wenn man den ganzen Inhalt eines Eies in ein Glastellerchen ausgießt und unbedeckt im Zimmer stehen läßt, so trocknet er allmählich aus, ohne daß man eine Fäulnis dabei bemerkt, und ohne daß irgendwelche übelriechenden Gase entstehen. Wenn man Eiweiß und Eigelb je in eine sterilisierte Petrischale ausgießt und sie unbedeckt bei 13 bis 18° im Zimmer stehen läßt, so ist es natürlich, daß beide anfangen auszutrocknen, — dieses Austrocknen geht sehr schnell vor sich. Zuletzt verwandelt sich das Eiereiweiß in eine trockene Rinde, die das Aussehen und die Farbe von Gummi-arabicum hat. Das Austrocknen des Eigelbes geschieht nicht so schnell; es schrumpft ganz allmählich zusammen, indem es sich zuerst in eine schmierige und dann in eine lockere leicht auseinander fallende Masse verwandelt. In der Periode des Austrocknens nahm ich täglich Proben zu bakteriologischen Untersuchungen. Darauf machte ich Aussaaten auf Gelatine und Agar (Ausstriche), und fast in allen Fällen erwies es sich, daß die Proben keine Bakterien enthielten. Leider konnte ich diese Beobachtungen nur in den ersten 4 bis 5 Tagen vornehmen, da das Eiweiß zu schnell austrocknete; am 6. Tage verwandelte sich das Eiweiß gewöhnlich schon in eine dichte, zähe Masse und machte es schwierig oder durchaus unmöglich, Proben zu entnehmen. Ganz anders war das Ergebnis, wenn man dem Inhalte eines Eies $\frac{1}{2}$ bis 1^{ccm} Bouillon hinzufügte. Alsdann zeigten sich schon am 2. bis 3. Tage scharf hervortretende Zeichen der Eiweißfäulnis unter Verbreitung üblen Geruches. Von Sterilität konnte hier natürlich keine Rede sein.

Aus diesen Beobachtungen kann man schließen, daß die Keime, die sich im Luftstaube befinden, bekanntlich vorzugsweise Schimmel- und Hefepilze, im Eiweiße die zum Leben und zur Vermehrung nötigen Bedingungen nicht vorfinden. Schützt man den in eine sterile Petrischale gegossenen Inhalt eines Hühnereies durch Bedecken vor dem Austrocknen, so kann man am Eiweiß während einer langen Zeit (sogar ungefähr 2 Monate bei Zimmertemperatur) volle Sterilität beobachten, obgleich es fast unmöglich ist, bei der Hebung des Schalendeckels behufs Probeentnahme das Eindringen der Luftstaubkeime zu verhindern; auf dem Eigelb zeigt sich tatsächlich gewöhnlich schon in der 2. oder 3. Woche ein Schimmelansatz. Augenscheinlich kommt der Schimmel im Eiweiß um, oder findet in demselben keine günstigen Bedingungen zu seiner weiteren Entwicklung.

Außerdem habe ich mehrmals unter sonst gleichen Versuchsbedingungen dem Eiweiß eine geringe Quantität Wasser aus einer Wasserleitung zugefügt, um zu erproben, wie der Wuchs und die Vermehrung der „Wasserbakterien“ in einem für so günstig gehaltenen Nährboden vor sich geht. Es ergab sich, daß bei Zusatz einer kleinen Quantität Wasser ($\frac{1}{2}$ bis 1 Tropfen) das Eiweiß eine lange Zeit — einige Wochen, ja bis zu einem Monat — seine Sterilität bewahren konnte, soweit es wenigstens eine gewöhnliche Prüfung mittels Aussaat (1 Öse Eiweiß) auf Gelatine ergab. Wenn dem Eiweiß eine größere Quantität Wasser hinzugefügt wurde, so daß ungefähr 2^{ccm} auf ein Ei kamen, so konnte man — allerdings auch erst am 3. bis 4. Tage — das Vorhandensein von Bakterien, vorzugsweise von *Bac. fluorescens liquefaciens*, feststellen.

Nach diesen Vorversuchen habe ich Experimente mit Reinkulturen angestellt, zunächst von *Bac. subtilis*, und zwar von Stämmen, die keine Sporen hatten, wie auch von solchen, die sehr reich an ihnen waren.

Die Versuche wurden mit derselben Methodik angestellt, wie sie beim Studium der bakteriziden Eigenschaften des Serums üblich ist. — 1 bis 4^{ccm} Hühnereiweiß wurden in ein Probierglas getan, ein oder mehrere Tropfen Bouillon-Emulsion der zu untersuchenden Bakterien hinzugefügt und sogleich nach der Aussaat, sowie nach verschiedenen Zeiträumen Platten gegossen. Es zeigte sich, daß das Eiweiß eine erhebliche schädigende Wirkung auf die Bakterien ausübte. Einen genaueren Einblick in die Ergebnisse gewährt die folgende Tabelle:

Tabelle I.

a) *Bacillus subtilis* (sporenfrei).

Sofort nach der Aussaat	Nach 5 Stunden	Nach 24 Stunden	Nach 44 Stunden	Nach 72 Stunden
150	0	0	0	0
10 000	175	0	0	0
500 000	250	30	20	0

b) *Bacillus subtilis* (sporenreich).

55	0	0	0	—
630	0	0	0	—
60 000	10	1	0	—

Nach 72 Stunden konnte ich den ganzen Inhalt des Probierglases auf Gelatine aussäen, ohne eine einzige Kolonie zu erhalten. Daraus ist

zu entnehmen, daß der *Bac. subtilis* im Eiweiß abstirbt, eine Tatsache, die selbst bei sehr großen Aussaaten auf geringen Mengen (3 bis 4^{ccm}) Eiweiß beobachtet werden kann.

In Versuchen, die ich ferner mit *Bac. anthrax*, *megaterium*, *ramosus mycoides*, *proteus Zenckeri*, *Zopfii* anstellte, bewies das Eiweiß stets eine sehr starke bakterizide Wirkung, wobei der prot. *Zenckeri* und *Zopfii* sich empfindlicher zeigten als *Bac. subtilis*. Einige kurze Auszüge aus verschiedenen zu Protokoll genommenen Beobachtungen seien im Folgenden angeführt:

Tabelle II.

c) <i>Bacillus anthrax</i> .			d) <i>Proteus Zopfii</i> .		
Sofort nach der Aussaat	Nach 5 Stunden	Nach 24 Stunden	Sofort nach der Aussaat	Nach 2 Stunden	Nach 24 Stunden
50 Keime	0	0	300 Keime	0	0
300 „	2	0	700 „	2	0
700 „	20	0	1 400 „	100	0
			20 000 „	400	0

e) <i>Proteus Zenckeri</i> .			f) <i>Bacillus megaterium</i> .		
Sofort nach der Aussaat	Nach 2 Stunden	Nach 24 Stunden	Sofort nach der Aussaat	Nach 4 Stunden	Nach 24 Stunden
75 Keime	0	0	240 Keime	0	0
120 „	0	0	300 „	0	0
400 „	0	0	800 „	2	0
2000 „	2	0			

Bac. mycoides, *ramosus* verhalten sich zum Eiweiß ganz ebenso wie *Bac. megaterium*.

In einer zweiten Beobachtungsreihe suchte ich die Bedingungen der natürlichen Verunreinigung von Hühnereiern näher kennen zu lernen. Ich nahm nicht das Eiweiß allein, sondern den ganzen Inhalt eines Eies, goß ihn in eine Petrischale aus und fügte dem Eiweiß, das das unversehrte Eigelb umgab, einige Tropfen Bouillon-Emulsion (1 Öse Agar-Kultur auf 2^{ccm} Bouillon) der zu untersuchenden Bakterien hinzu. In zunächst mit *Bac. subtilis* angestellten Versuchen wurden dem Eiweiß 10 Tropfen Bouillonemulsion hinzugefügt. Tägliche Aussaaten von Eiweißproben auf Gelatine zeigten, daß das Eiweiß schon am vierten Tage frei vom *Bac. subtilis* war. Während der ganzen Beobachtungszeit behielten das Eiweiß, wie auch das Eigelb ihr natürliches Aussehen. In Experimenten mit *Bac. anthrax* wurden dem Eiweiß bei 37° 7 Tropfen Bouillonemulsion bei-

gefügt. Schon am dritten Tage waren die Eiweißproben steril; auch hier änderten während der ganzen Beobachtungszeit (9 Tage) Eiweiß und Eigelb ihr normales Aussehen nicht; nur war das Eigelb im Vergleich zu seinem früheren drallen, hervorstehenden Äußeren etwas platt geworden. Gleiche Resultate, d. h. einen vollständigen Untergang der Bakterien (*subtilis*, *antrax*, *megaterium*) kann man bei Versuchen, sie im Hühnerei zu kultivieren, beobachten. Ich bediente mich hierbei ungefähr der gleichen Technik, die zur Kultivierung der Bakterien in Eiern mit möglichst unversehrter Schale empfohlen ist.

Frische Hühnereier wurden zuerst von ihrer Außenseite mit 50% Alkohol eingerieben und darauf von außen ganz leicht mit der Flamme eines Bunsenbrenners angebrannt. Ins zugespitzte Ende des Eies wurden hierauf mit einer Nadel kleine Öffnungen gemacht und einige Tropfen des Eiweißes mittels einer dünnen Pipette herausgesogen und durch die gleiche Menge Bouillonemulsion der zu untersuchenden Bakterien ersetzt. Die Eier wurden entweder bei Zimmertemperatur oder bei 37° in einer feuchten Kammer gehalten. Nach 72 Stunden wurden sie zerschlagen, ihr Inhalt in eine Petrischale ausgegossen und einer bakteriologischen Untersuchung unterworfen. Die Außenseite der Eierschale überzog sich gewöhnlich mit einem leichten Schimmelansatz. Der Inhalt des Eies erwies sich aber als steril.

Das allmähliche Absterben der Bakterien (*subtilis*, prot. Zopfi, Zenckeri) im Eiweiße kann man sehr deutlich beobachten, wenn man die eben erwähnten Bakterien ins Eiweiß aussät und nach einer kleinen Zwischenzeit (2 bis 5 bis 24 Stunden) aus dem zu untersuchenden Materiale gefärbte Präparate herstellt. Vor allem kann man sich überzeugen, daß von Stunde zu Stunde die Anzahl der Bakterien im Gesichtsfelde abnimmt, bis sie zuletzt ganz verschwinden. Schon in den ersten Stunden kann man eine immer zunehmende Anzahl schwach gefärbter Bakterien bemerken. Zu gleicher Zeit kann man ein allmähliches grobkörniges Auseinanderfallen des Endoplasmas wahrnehmen, während das Ektoplasma noch erhalten bleibt, bis zuletzt die endgültige Auflösung erfolgt.

Stellt man die Beobachtungen im hängenden Tropfen an, so bemerkt man, daß bei *Bac. subtilis* und anderen die Beweglichkeit allmählich verloren geht, bis sie zuletzt ganz aufhört (nach 5 Stunden). Agglutinationserscheinungen werden dabei nicht wahrgenommen. Die Umrise der Bakterien werden immer schwächer, es beginnt deren körniger Zerfall, und nach 24 bis 48 Stunden kann man nur mit Mühe im Gesichtsfelde noch Plasmakörnchen wahrnehmen. Im allgemeinen tritt jetzt der Zustand ein, der als das sog. „Pfeiffersche Phänomen“ charakterisiert wird.

Sucht man zu einem Verständnis dieser Erscheinungen zu gelangen, so liegt es nahe, den Untergang der Bakterien als Folge plasmolytischer Vorgänge oder so schlechter Ernährungsbedingungen aufzufassen, daß sie schnell umkommen und nicht imstande sind, sich eine längere Zeit zu erhalten. Beide Annahmen müssen aber auf Grund folgender Beobachtungen verneint werden. Ich verdünnte das Eiweiß mit Bouillon, um günstige Ernährungsbedingungen zu schaffen, oder mit destilliertem Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung, um schädliche osmotische Einflüsse möglichst auszuschließen und gelangte zu nachstehenden Ergebnissen:

Tabelle III.

Bac. subtilis.

a) Verdünnung mit Bouillon.

Nr.	Eiweiß 1 Teil, Bouillon:	Sofort nach Aussaat	Nach 5 Stunden	Nach 24 Stunden
1	$\frac{1}{3}$ Teil ¹	70	0	0
2	$\frac{1}{2}$ „	3 800	0	0
3	1 „	27	5	0
4	1 „	280	20	0
5	2 Teile	3 000	0	0
6	2 „	10 000	∞	∞

b) Verdünnung mit destilliertem Wasser.

Nr.	Eiweiß 1 Teil, dest. Wasser:	Sofort nach Aussaat	Nach 5 Stunden	Nach 24 Stunden
1	$\frac{1}{2}$ Teil	170	0	0
2	1 „	340	0	0
3	2 Teile	75	0	0
4	5 „	200	0	0
5	10 „	400	0	0

c) Verdünnung mit ClNa-Lösung.

Nr.	Eiweiß 1 Teil, Salzlösung:	Sofort nach Aussaat	Nach 5 Stunden	Nach 24 Stunden
1	$\frac{1}{2}$ Teil	1000	0	0
2	1 „	780	0	0
3	3 Teile	320	0	0
4	5 „	120	0	0
5	10 „	400	0	0

¹ Z. B. 3 ccm Eiweiß + 1 ccm Bouillon.

Die Resultate traten noch deutlicher in Versuchen mit *Bac. Zopfi* und *Zenkeri* hervor: Hier blieb die keimtötende Wirkung des Eiweißes sogar dann erhalten, wenn man es 50 mal mit Bouillon verdünnte, sobald man verhältnismäßig kleine Aussaaten der erwähnten Bakterien vornahm.

Auf Grund dieser Beobachtungen muß man zu dem Schlusse gelangen, daß in dem Eiweiße des Hühnereies sich Enzyme proteolytischen Charakters befinden. Die keimtötende Wirkung dieser Enzyme ist so groß, daß sie erst bei verhältnismäßig starker Verdünnung des Eiweißes mit Bouillon aufgehoben werden kann. Die Alexine des Blutserums sind in dieser Beziehung viel empfindlicher. Die Enzyme des Eiweißes werden durch eine starke Verdünnung mit destilliertem Wasser oder eine ClNa -Lösung nicht geschwächt. Von großem Interesse war es nun, was für eine Wirkung das Erhitzen auf die Enzyme des Eiweißes ausübt. Hierüber gibt die folgende Tabelle Auskunft.

Tabelle IV.
Bac. subtilis. Reines Eiweiß.

Nr.		Sofort nach der Aussaat	Nach 6 Stunden	Nach 24 Stunden
1 } 2 }	Hühnereiereiweiß roh	400 900	0 0	0 0
3 } 4 }	Hühnereiereiweiß nach $\frac{1}{2}$ stündiger Erhitzung bei 55 bis 60°	1800 2000	0 0	0 0
5 } 6 }	Hühnereiereiweiß nach $\frac{1}{2}$ stündiger Erhitzung bei 65 bis 70°	1000 800	3000 20000	∞ ∞

Bei Erhitzung des Eiweißes auf 55 bis 60°, wodurch es eine trübe, grünliche Farbe annimmt, gehen demnach nur geringe Veränderungen der keimtötenden Fähigkeit vor sich. Bei Erhitzung auf 65 bis 70° gerinnt das Eiweiß und verliert nunmehr vollständig seine Wirksamkeit.

Aus den Arbeiten von Hippus (14) ist zu ersehen, daß die Bactericidie frischer Kuhmilch bei einer Erhitzung von 65° geschwächt wird und bei Erhitzung bis 75° ganz verloren geht.

Die Bactericidie der Ziegenmilch verliert sich nach Fokker (15) bei einer Erhitzung von 70°. In dieser Beziehung besteht also eine Ähnlichkeit zwischen den Enzymen der Ziegenmilch und des Hühnereiereiweißes.

Es ist bemerkenswert, daß die Bactericidie des Hühnereiereiweißes sehr abnimmt, wenn man dem Eiweiße das Eigelb beimischt. So bildet z. B. für *Bac. subtilis* und anthrax das Gemisch einen ziemlich günstigen Nährboden. Dringt man bei Züchtungsversuchen mit Bakterien in

Hühnereiern bei Einführung der Kultur durch die Öffnung in der Eischale mit der Platinöse bis zum Eigelb vor, so kann man Wachstum bei *Bac. subtilis*, *anthrax* u. a. erzielen. Vielleicht gibt Hueppe eben deshalb den Rat, die Hühnereier vor dem Gebrauche durchzuschütteln, damit sich im Innern des Eies ein Gemisch bilde, das dem Wachstum der Bakterien einigermaßen förderlich ist.

Zum Schlusse möchte ich hinzufügen, daß es außer den hier erwähnten Bakterien noch eine ganze Reihe anderer Arten gibt, die im Hühnereier-eiweiße zugrunde gehen. Andererseits gibt es eine recht erhebliche Anzahl Bakterien, die im Eiweiße verhältnismäßig gut fortkommen (*proteus mirabilis*, *vulgaris*, *prodigiosus*, *B. fluorescens liquefaciens*, *B. typhi*, *V. cholerae*, *B. coli communis* u. a.). Einige Arten (z. B. *tetragenus*, *pyogenes foetidus*) sind einer, wenn auch bemerkbaren, so doch relativ schwachen keimtötenden Wirkung des Hühnereierweißes unterworfen.

Literatur-Verzeichnis.

1. Hueppe, Über Verwendung von Eiern zu Kulturzwecken. *Centralblatt für Bakteriologie*. 1888.
 2. Günther, *Einführung in das Studium der Bakteriologie*.
 3. Zörkendörfer, *Archiv für Hygiene*. 1893.
 4. Hammerl, Über die in rohen Eiern durch das Wachstum von Cholera-vibrionen hervorgerufenen Veränderungen. *Diese Zeitschrift*. Bd. XVIII.
 5. Abel u. Draeer, Das Hühnerei als Kulturmedium für die Cholera-vibrionen. *Ebenda*. Bd. XIX.
 6. Piorkowsky, Über die Einwanderung des Typhusbacillus in das Hühnerei. *Archiv für Hygiene*. Bd. XXV.
 7. Hueppe u. Tajan, Über Kulturen im Hühnerei. Anaërobiose der Cholera-bakterien. *Ebenda*. Bd. II.
 8. Zenthoffer, Über das Verhalten der Cholera-kulturen in Hühnereiern. *Diese Zeitschrift*. Bd. XVI.
 9. Lange, Über das Eindringen von Bakterien in das Hühnerei durch die Exhole. *Archiv für Hygiene*. Bd. LXII.
 10. Sachs-Mücke, Können lebende Dysenteriebazillen die Eiwand des frischen Hühnereies durchwachsen? *Ebenda*.
 11. Bonhoff, Untersuchungen über Giftbildung verschiedener Vibrionen in Hühnereiern. *Ebenda*. Bd. XXII.
 12. Wilm, Über die Einwanderung von Cholera-vibrionen ins Hühnerei. *Ebenda*. Bd. XXIII.
 13. Kemper, Über Schwefelwasserstoffbildung der Cholera-vibrionen i. Hühnerei. *Ebenda*. Bd. XXI.
 14. Hippius, Biologisches zur Milchpasteurisierung. *Jahrbuch für Kinderheil-kunde*. Bd. LXI.
 15. Fokker, Über bakterienvernichtende Eigenschaft der Milch. *Diese Zeitschrift*. Bd. IX.
-