Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 8 (1917)

Heft: 2

Artikel: Ueber die Brauchbarkeit des Indolnachweisverfahrens nach Morelli bei Kulturen von Bacterium coli.

Autor: Thöni, J. / Geilinger, H.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-984297

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 31.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

MITTEILUNGEN
AUS DEM GEBIETE DER
LEBENSMITTELUNTERSUCHUNG UND HYGIENE
VERÖFFENTLICHT VOM SCHWEIZ. GESUNDHEITSAMT

TRAVAUX DE CHIMIE ALIMENTAIRE ET D'HYGIÈNE
PUBLIÉS PAR LE SERVICE SUISSE DE L'HYGIÈNE PUBLIQUE

ABONNEMENT: Schweiz Fr. 8. 20 per Jahrg. — Ausland Fr. 10. — oder M. 8. —.
Suisse fr. 8. 20 par année. — Etranger fr. 10. — ou M. 8. —.
Preis einzelner Hefte Fr. 1. 50 (Ausland M. 1. 50).
Prix des fascicules fr. 1. 50 (étranger M. 1. 50).

BAND VIII 1917 HEFT 2

Ueber die Brauchbarkeit des Indolnachweisverfahrens nach Morelli bei Kulturen von Bacterium coli.

Von J. THÖNI und H. GEILINGER.

(Mitteilung aus dem Laboratorium des Schweiz. Gesundheitsamtes.)

Der Nachweis der Befähigung von Mikroorganismen, aus dem Eiweissmolekül bei seinem Abbau Indol zu bilden, hat von jeher in der Bakteriendiagnostik eine Rolle gespielt und erlangte dann beim Studium der Varietäten des *Bact. coli* eine besondere Wichtigkeit. Seit *Kitasato* im Jahre 1889 zu diesem Zwecke die *Salkowski*'sche Reaktion empfohlen hatte, ist die bakteriologische Technik noch mit einer Anzahl von weiteren solchen Methoden bereichert worden. Der Grund dafür lag vor allem in zahlreichen Beobachtungen mangelnder Zuverlässigkeit dieser Verfahren, welche, wie sich bald zeigte, hauptsächlich bedingt wurde durch die ungleiche Zusammensetzung der bei der Erforschung des Indolbildungsvermögens verwendeten Nährsubstrate. Der Benützung von Fleischwasserpeptonbouillon stand ihr mehr oder weniger grosser Zuckergehalt hindernd im Wege, aber auch bei ausschaltung der Fleischbrühe bildete die Inkonstanz der zu verwendenden Peptonpräparate immer noch ein sehr unerwünschtes Hemmnis. Es ist deshalb von *Zipfel* der Vorschlag gemacht worden, diesen unbestimmten Faktor durch die Verwendung von Tryptophan, der Indol-α-aminopropionsäure, an Stelle von Pepton auszuschalten. Mit einer Asparagin, Ammoniumlaktat, Dikaliumphosphat und Magnesiumsulfat enthaltenden, 0,3 ‰igen Tryptophannährlösung haben sich ihm die Methoden nach *Salkowski-Kitasato, Ehrlich-Böhme, Zinno* und *Morelli* als ungefähr gleichwertig erwiesen.

Die Veranlassung zu den vorliegenden Untersuchungen wurde gegeben einerseits durch das Bestreben, ein für die Untersuchungspraxis, wie sie

in den kantonalen chemischen Laboratorien ausgeübt wird, möglichst einfaches und zuverlässiges Indolnachweisverfahren ausfindig zu machen, das uns in der *Morelli*-Reaktion verwirklicht zu sein schien, andererseits durch den Mangel an Uebereinstimmung in der Beurteilung dieser Methode von Seiten der nachprüfenden Autoren. *Konrich* hatte das Verfahren bei 370 Colistämmen angewendet und es als «nahezu unbrauchbar gefunden» und zwar einmal wegen der Undeutlichkeit der Reaktion und ferner wegen ihres späten, «frühestens am 2., allermeist aber erst am 3.—5. Tage» stattfindenden Auftretens. Demgegenüber kam *Zipfel* zu viel bessern Resultaten. In allen Kulturen, in denen der Indolnachweis mit den anderen Reaktionen gelang, war das auch der Fall mit der *Morelli*'schen Methode, indem der eintretende, rosarote Farbenausschlag immer unschwer zu beobachten war, während er ebenso unzweifelhaft bei den Kulturen ohne Indolbildung fehlte. Er bemerkt, dass ihm das Verfahren als einfache und bequeme Kontrolle den anderen Indolproben gegenüber von Vorteil gewesen sei.

Morelli hat sich die Tatsache zunutze gemacht, dass kristallinische Oxalsäure in Gegenwart von Indol eine rote Farbe annimmt. Er gibt über die von ihm befolgte Technik folgendes an: «Da nun Indol eine flüchtige Substanz ist, so dachte ich, dasselbe in der über dem Nährboden liegenden Atmosphäre erfolgreich aufsuchen zu können. Das hierzu angewandte Verfahren habe ich folgendermassen angegeben: In eine warmgesättigte Oxalsäurelösung wird ein Streifen Fliesspapier getaucht. Beim Erkalten bleibt derselbe mit fester Oxalsäure gänzlich belegt, da dieser Körper in der Kälte weniger löslich ist als in der Wärme. Der sterilisierte Papierstreifen wird dann in die Atmosphäre des Reagensglases aufgehängt. Durch Einwirkung des von den Mikroorganismen erzeugten Indols nimmt die anfangs weisse Oxalsäure allmählich eine rote Färbung an, die schliesslich zu einer ganz ausgesprochenen wird, wenn die Säure durch längere Zeit mit den Dämpfen in Berührung bleibt. Behufs leichterer Ausführung erscheint es hierbei angezeigt, die Streifen am distalen Ende spitzwinklig umzubiegen. Die dadurch entstandene Knickung dient dazu, den Streifen am Rande des Röhrchens vor Schliessung desselben festzuhalten». *Morelli* gibt eine Anzahl von Nährsubstraten an, die sich für die Ausführung der Reaktion eignen sollen, so die gewöhnliche Nährbouillon, traubenzuckerhaltige sowie mit *Liebigs* Fleischextrakt versetzte Bouillon, Peptonwasser, Plasmonlösung, Milch, ferner gewöhnlichen und traubenzuckerhaltigen Nähragar, Nährgelatine, Kartoffeln, *Achalme*'sches Substrat. (Mit Gelatinelösung allein konnte er niemals Indol nachweisen, was beim Fehlen der Tryptophangruppe in diesem Eiweisskörper auch nicht zu erwarten war.) Als Mikroorganismen für seine Versuche benützte er unter anderen verschiedene Stämme von *Bact. coli, Choleravibrionen, choleraähnliche Vibrionen, Typhusbazillen, Paratyphusbazillen, Bacillus fœcalis alcaligenes, Bacillus enteritidis (Gärtner).* Die Resultate der Oxalsäureprobe stimmten stets mit denjenigen der bisanhin bekannten Reaktionen überein. Zur Erzielung einer raschen Indolreaktion

waren besonders die peptonhaltigen Substrate geeignet. Hier liess sich oft schon nach wenigen Stunden eine deutliche Reaktion nachweisen, zu einer Zeit, wo die *Salkowski*'sche und *Ehrlich*'sche Probe häufig noch versagten. Auch mit Nähragar soll die Reaktion schon nach 12 Stunden zu erkennen sein.

Wie diese Angaben zeigen, übertrifft diese Methode an Einfachheit der Technik und Wohlfeilheit alle andern, so dass ihr, gleiche Leistungsfähigkeit vorausgesetzt, der Vorzug gegeben werden müsste. *Morelli* macht noch auf einige weitere Vorteile seiner Methode aufmerksam: Sie soll für Indol spezifisch sein, da ja nur das verdampfende Indol zur Reaktion gelangt, Täuschungen durch im Substrat enthaltene anderweitige Substanzen also ausgeschlossen sind; die Indolbildung könne (wie oben bereits erwähnt) ferner auch bei festen Nährböden verfolgt werden; sie könne der Beobachtung nie entgehen (was bei den anderen Methoden möglich sei entweder bei zu früher Prüfung der Kultur, wenn die Indolbildung langsam einsetzt oder aber bei zu später Untersuchung derselben, wenn das gebildete Indol schon verdampft ist), weil die Reaktionssubstanz unmittelbar nach der Impfung der Einwirkung der Kultur überlassen bleiben könne (die einmal entstandene Rosafärbung der Oxalsäurestreifen bleibt nämlich bestehen). Als besonderen Vorzug erwähnt er die Möglichkeit, die Indolbildung verfolgen zu können ohne Zerstörung der Kultur.

Morelli vindiziert nun seiner Methode auch grössere Empfindlichkeit «den bisher bekannten Reaktionen gegenüber», eine Eigenschaft, deren Vorhandensein ihr eine Vorzugsstellung einräumen würde. Es ist dabei darauf hinzuweisen, dass in Anbetracht der Eigenart dieses Verfahrens a priori nicht angenommen werden darf, dass Empfindlichkeit und Raschheit des Indolnachweises dabei Hand in Hand gehen, da es denkbar ist, dass kleinste Indolmengen, auf welche die Reaktion als solche ansprechen würde, eben noch einer gewissen Zeit bis zur vollständigen Verdampfung bedürfen, einer Zeit, während der die Methoden, welche diese Substanz in der Kulturflüssigkeit selber aufsuchen, vielleicht schon ein positives Resultat ergeben würden. Nun ist aber gerade die Raschheit des Indolnachweises ein Postulat, welchem betreffend der Brauchbarkeit einer solchen Reaktion grosse Bedeutung zukommt.

Unsere Versuche sollten also vor allem der Klärung dieser Frage dienen, ferner wollten wir noch die weitere Angabe *Morelli*'s nachprüfen, dass es nämlich mit seiner Methode im Gegensatz zu den andern gelinge, die Bildung von Indol auch in traubenzuckerhaltigen Substraten nachzuweisen. (Wie bereits erwähnt gelang ihm der Nachweis auch in Milch.) Es sei hier noch bemerkt, dass wir mit *Zipfel* vollständig davon überzeugt sind, dass es bei künftigen derartigen Untersuchungen im allgemeinen bestimmt zusammengesetzte Tryptophansubstrate sein werden, die sich für die Klärung dieser Fragen am besten eignen. Wenn wir hier noch bei dem herkömmlichen Peptonwasser geblieben sind, so hat das seinen Grund in der etwas schwierigen Beschaffbarkeit dieses Körpers, die bei der Orientierung unseres Vorhabens erschwerend ins Gewicht fallen musste.

Ueber die von uns zur Kontrolle herangezogenen Verfahren sei hier kurz folgendes bemerkt:

Wir benützten dabei das älteste, mit Modifikationen immer noch ausgeübte Verfahren nach *Salkowski-Kitasato*, ferner das als am empfindlichsten geltende nach *Ehrlich-Böhme* und endlich eine in neuester Zeit empfohlene Methode von *Baudisch*. Eine Berücksichtigung weiterer Reaktionen, wie z. B. der Nitroprussidnatriumprobe, hielten wir nicht für notwendig, nicht sowohl aus dem Grunde, weil sie den andern gegenüber weniger gute Ergebnisse lieferten, als wegen ihrem bezüglich der Technik nichts wesentlich Eigentümliches bietenden Charakter.

Die Reaktion von *Salkowski-Kitasato* beruht auf der Ueberführung des Indols in das durch seine rote Farbe gekennzeichnete salpetersaure Nitrosoindol, was durch Zusatz von Schwefelsäure und eines salpetrigsauren Salzes zur Kulturflüssigkeit geschieht. *Kitasato* setzte «zu 10 cm^3 peptonhaltiger alkalischer Bouillonkultur..., welche 24 Stunden lang bei Bruttemperatur gestanden hat, 1 cm^3 einer Lösung von reinem Kaliumnitrit, die 0,02 in 100 cm^3 enthält und dann einige Tropfen konzentrierter Schwefelsäure zu». Es zeigte sich aber bald, dass verschiedene Umstände die Brauchbarkeit der Probe in Frage stellten. *Bleisch* wies nach, dass zum Zustandekommen der Rotfärbung ein bestimmtes Verhältnis zwischen Nitrit und Indol bestehen muss, *Lösener* machte darauf aufmerksam, dass durch den Zusatz der konzentrierten Schwefelsäure eine bräunliche oder dunkelgelbe Verfärbung des Nährbodens zustande kommen kann, welche das Rot der Reaktion verdeckt, dass aber andererseits auch Rosa- oder Rotfärbungen auftreten können ohne Anwesenheit von Indol. Um diese Uebelstände auszuschalten, wurden darum eine Reihe von Modifikationen empfohlen, man verwendete z. B. anstelle der konzentrierten Schwefelsäure verdünnte Schwefelsäure oder andere Säuren. *Pöhl* hat angegeben, dass der von der Indolbildung herrührende Farbstoff beim Schütteln der Kulturen mit Amylalkohol durch letzteren extrahiert wird. Dadurch werden einmal ganz schwache oder durch Braunfärbung des Nährbodens verdeckte Reaktionen erkennbar gemacht und dann wird dadurch ferner ein weiteres Argument für die Spezifizität der Reaktion beigebracht, indem die meisten durch andere Körper zustande gekommenen Farbstoffe im Amylalkohol nicht löslich sind. *Konrich* hat gezeigt, dass durch die Verwendung einer geringeren Nitritdosis die Empfindlichkeit der Reaktion wesentlich erhöht werden kann. Nach *Lehmann* und *Neumann* soll zuerst nur die Schwefelsäure zugesetzt und dann auf 80° erwärmt werden zwecks Nachweis von eventuell bereits vorhandenem Nitrit (Cholerarotreaktion). Erst bei negativem Ausfall der Probe soll dann Nitrit zugefügt werden. Aus alledem ist zu verstehen, wenn in der Literatur eine ganze Anzahl mehr oder weniger differierender Vorschriften zur Ausführung der Reaktion bestehen. Wir haben uns anfänglich an diejenige von *Lehmann* und *Neumann*, später an diejenige von *Conradi* und *Bierast* und endlich an jene von *Zipfel* gehalten.

Im Jahre 1906 empfahl dann *Böhme* die *Ehrlich*'sche Reaktion hauptsächlich in anbetracht ihrer Unabhängigkeit vom gegenseitigen Mischungsverhältnis von Indol und Nitrit. Sie beruht nach *Emil Fischer* auf der Kondensation zweier Indolmoleküle mit einem Molekül p-Dimethylamidobenzaldehyd unter Wasseraustritt zu einem Rosindol, das die Leukobase eines intensiv roten Farbstoffes darstellt und durch Oxydation in diesen übergeführt wird. Als Stammlösungen der Reagenzien gibt *Böhme* an:

« 1. Paradimethylamidobenzaldehyd 4
Alkohol (96 %ig) 380
Salzsäure, konzentrierte 80
2. Kaliumpersulfat in gesättigter wässeriger Lösung (als Oxydationsmittel).

Zu etwa 10 cm³ der zu prüfenden Flüssigkeit (Bouillonkultur) werden 5 cm³ der Lösung 1, dann 5 cm³ der Lösung 2 zugesetzt, das Gemisch geschüttelt. Bei Anwesenheit von Indol tritt sofort oder bei geringerer Konzentration binnen weniger Minuten eine intensive Rotfärbung auf; durch Amylalkohol kann der entstehende Farbstoff ausgeschüttelt werden. Die Intensität der Färbung nimmt mitunter nach längerer Zeit wieder ab. Eine Beobachtungsdauer von 5 Minuten genügt in allen Fällen zur Feststellung der Reaktion.» Die Reaktion soll etwa 10 mal empfindlicher sein als die *Salkowski-Kitasato*'sche. Auch dieses Verfahren ist für Indol nicht ganz spezifisch. Doch sollen die zu Täuschung Anlass gebenden Substanzen nach *Zipfel* beim bakteriellen Indolnachweis nicht in Betracht kommen ausser Skatol, welches sich aber leicht von Indol unterscheiden lässt, indem der Reaktionsfarbstoff des Skatols in Chloroform mit blauer, derjenige des Indols mit violetter Farbe in Lösung geht. Es wurde schon von *Böhme* die Beobachtung gemacht, dass auch ungeimpftes Peptonwasser mit den Reagenzien eine schwache Rotfärbung erzeugen kann. Dieser Farbstoff unterscheidet sich vom Indolfarbstoff durch seine Unlöslichkeit in Chloroform. Dieses ist als Ausschüttelungsmittel überhaupt ausschliesslich zu empfehlen, denn der Amylalkohol kann bei Zusatz der Reagenzien ohne Gegenwart von Indol selber eine intensive Rotfärbung annehmen, worauf *Zipfel*, wie wir uns selber überzeugt haben, mit Recht aufmerksam macht[1]). Diese Tatsache

[1]) Die Reaktionssubstanzen wurden in den nachbezeichneten Mengenverhältnissen gemischt:

	I	II	III	IV	V
a) Amylalkohol	1	2	3	2	4 cm³
$K_2S_2O_8$	3	3	3	1	1 »
Ehrlichs Reagens	3	3	3	1	1 »

Es tritt fast sofort eine Rotfärbung auf, in I, II, III kirschrot, in IV hellkirschrot, dann dunkler werdend, in V hellkirschrot. Dasselbe ist zu beobachten bei Weglassung von Kaliumpersulfat. Nach 4½ Stunden sind die letzteren Gemische lila, I helllila.

Zu den Röhrchen mit Persulfat werden nach 10 Minuten je 5 cm³ dest. Wasser gesetzt und stark geschüttelt. Nach einiger Zeit zeigt sich die wässerige Schicht fast ganz entfärbt, nachdem sie ganz klar geworden. Nach etwa 4½ Stunden ist die Amylalkoholschicht von I blasslila, von II bis V lila.

war uns zu Beginn unserer vergleichenden Prüfungen leider nicht bekannt, und so hielten wir uns anfänglich an die *Böhme*'sche Vorschrift. Wir verglichen daher die Verfahren mit Amylalkohol und mit Chloroform an der uns nachträglich noch zur Verfügung stehenden Hälfte der verwendeten Versuchsorganismen und gelangten zu den in folgender Tabelle wiedergegebenen Befunden.

Tabelle 1.

Die Ehrlich-Böhme-Reaktion mit Amylalkohol als Extraktionsmittel einerseits, Chloroform andererseits.

Coli-Stämme	24st. Amylalkohol	48st. Amylalkohol	24st. Chloroform	48st. Chloroform	Morelli (Kontrolle)
I A	kirschrot	kirschrot	kirschrot	kirschrot	+
I B	rosa (fleischrot)	granatrot	blassrosa*	rosa*	+
I C	farblos (nach 5 Min. schwach rosa)	farblos	farblos*	farblos*	—
I D	farblos (nach 5 Min. schwach rosa)	farblos	farblos*	farblos*	—
I E	kirschrot	kirschrot	kirschrot	kirschrot	+
I F	farblos (nach 5 Min. schwach rosa)	granatrot	blassrosa*	rosa*	+
I G	rosa (fleischrot)	granatrot	blassrosa*	rosa*	+
I J	kirschrot	kirschrot	kirschrot	lila	+
I R	kirschrot	kirschrot	kirschrot	kirschrot	+
I Y	farblos (später schwach rosa)	hellrosa!	farblos*	farblos*	—
I Z	kirschrot	kirschrot	kirschrot	kirschrot	+

* Farbe konstant bleibend.

Es ist daraus zu entnehmen, dass die Störung innerhalb der ersten 5 Minuten nach der Mischung der Reagenzien sich kaum bemerkbar macht. Dieser Termin wurde von uns bei der Notierung der Befunde immer innegehalten.

---

[1]) (Fortsetzung der Fussnote S. 69):

b) Zu je 10 cm³ dest. Wasser werden gesetzt:

	I	II
$K_2S_2O_8$	5	— cm³
Ehrlichs Reagens	5	5 »
Amylalkohol	2	2 »

und geschüttelt. Nach ca. 30 Sekunden macht sich eine Rosafärbung bemerkbar, in I heller, in II dunkler. Amylalkoholschicht und wässerige Schicht sind zuerst etwa gleich stark verfärbt. Nach ½ Stunde zeigt sich die wässerige Schicht bei I beinahe entfärbt, die Amylalkoholschicht hellrosa, während bei II die Rosafärbung auch nach dem Klarwerden der wässerigen Schicht in dieser nur wenig schwächer ist als in der Alkoholschicht.

c) Zu je 10 cm³ Wasser werden gesetzt:

	I	II
$K_2S_2O_8$	5	— cm³
Ehrlichs Reagens	5	5 »
Chloroform	2	2 »

und geschüttelt. Die Mischungen verfärben sich nicht.

Als an Empfindlichkeit der *Böhme*'schen Reaktion nicht nachstehend bezeichnet *Baudisch* seine Indolnachweismethode mittels Nitromethan. Ueber ihren Chemismus ist uns nichts bekannt, der Autor macht darüber in der Mitteilung, die uns einzig zur Verfügung stand, keine näheren Angaben. Sie soll auch bei Agarnährmedien verwendbar sein. «Das Nitromethan kann man entweder schon bei der Bereitung von Nähragar diesem zusetzen; es braucht nur wenige Tropfen Nitromethan auf grosse Agarmengen . . . Man kann aber auch das Nitromethan anstatt der Agarlösung der verdünnten, ca. 10- bis 20%igen Lauge hinzusetzen, der Effekt bleibt der gleiche.» Ueber die Ausführung der Reaktion gibt *Baudisch* folgendes an, wobei er Bezug nimmt auf Oberflächenkulturen von *Cholera* auf Agarplatten: «Nach 8- bis 16-stündigem Wachstum im Brutschrank umgrenzt man mit der Platinöse oder besser mit einem Platinspatel die zu untersuchende Kolonie oder besser Koloniengruppe mit dem darunterliegenden Agar, hebt dann die Kolonie mit dem Agarbett heraus und gibt das Ganze in ein Reagensglas. Enthielt der Agar bereits Nitromethan . ., so braucht man in das Reagensglas nur verdünnte Kalilauge zu geben und aufzukochen. Die heisse Lösung kühlt man am Wasserhahn etwas ab, gibt ca. 1 cm³ Amylalkohol hinzu, schüttelt gut durch und nun fügt man konzentrierte Salzsäure im Ueberschuss unter abermaligem Schütteln bei. Damit sich der Amylalkohol gut absetzt, erwärmt man das Ganze nochmals fast bis zum Kochen. Der abgetrennte Amylalkohol ist, wenn die Kolonien auch nur äusserst geringe Mengen Indol produziert hatten, rot oder rosa gefärbt und zwar wechselt die Intensität der Färbung je nach dem Indolgehalt. Enthielt der Agar kein Nitromethan, so gibt man einige Tropfen von diesem Reagens zu der verdünnten Lauge, die dann in dieser Form für die Indolreaktion immer bereit ist.» Wir haben bei Ausführung der Reaktion das Nitromethan in Mischung mit der Lauge in Anwendung gebracht. [1]) Dabei hielten wir uns an folgendes Mengenverhältnis der Reagenzien, das sich uns nach einigen Vorversuchen als zweckentsprechend erwiesen hat:

Indolhaltige Flüssigkeit	1 cm³ (oder 2 cm³)
Kalilauge-Nitromethanlösung	0,5 cm³ (oder 1 cm³)
Amylalkohol	0,5 cm³
konzentrierte Salzsäure	im Ueberschuss.

[1]) Die Erzielung einer positiven Reaktion mit sicher indolbildenden *Coli*stämmen bei Versetzung der Nährmedien (Nähragar oder Peptonwasser) mit Nitromethan ist uns zwar nicht gelungen (bei positiven Kontrollen: dieselben Nährmedien ohne Nitromethan und Ausführung der Probe nach *Baudisch* mit dessen nachträglicher Verwendung), doch dürfen wir uns darüber kein Urteil erlauben, indem erstens die relative Grösse des Nitromethanzusatzes (0,5 bis 1%) bereits hemmend auf das Bakterienwachstum einwirkte und zweitens gewöhnlicher, aus Fleischwasser hergestellter Agar zur Verwendung kam, der bekanntlich durch Zuckergehalt die Indolreaktion stören kann. Da für uns diese Frage von untergeordneter Bedeutung war, so haben wir es bei diesen unmassgeblichen Versuchen bewenden lassen.

Als Kalilauge - Nitromethangemisch benutzten wir eine wässerige Lösung, die 10 % Kalilauge und 0,5 % Nitromethan enthielt. Wir glauben aber hervorheben zu müssen, dass wir einige Male mit diesem Gemisch, wenn es bereits einen oder mehrere Tage alt war, abgeschwächte positive oder negative Reaktionen bekamen in Fällen, wo sich mit frisch angesetzter Kalilauge-Nitromethanmischung schöne positive Reaktionen erzielen liessen. Wir stellten daher jeweilen das Gemisch kurz vor seiner Verwendung frisch her, wobei wir durch tüchtiges Schütteln das Nitromethan in der 10 %igen Lauge rasch in Lösung brachten.

Um zunächst über die Empfindlichkeit der 4 Indolreaktionen orientiert zu sein, prüften wir dieselben an Lösungen von Indol (von *Kahlbaum* bezogen) in destilliertem Wasser und 1 %igem Peptonwasser. Sie wurden wie folgt ausgeführt:

1. Reaktion nach *Morelli*: 10 cm³ Indollösung; Oxalsäurestreifenende 2 cm über dem Flüssigkeitsniveau; Beobachtung nach 24stündigem Aufenthalt bei 37° C. im durchfallenden Licht.
2. Reaktion nach *Salkowski-Kitasato*: 10 cm³ Indollösung + 0,5 cm³ Kaliumnitritlösung (0,02 %ig, in destilliertem Wasser, frisch hergestellt) + 1,5 cm³ Schwefelsäure (10 %ig); Mischen; + 1 cm³ Amylalkohol (Mischen).
3. Reaktion nach *Ehrlich-Böhme*: 1,0 cm³ Indollösung + 0,5 cm³ konzentrierte wässerige Kaliumpersulfatlösung (Mischen) + 0,5 cm³ Dimethylamidobenzaldehydreagens (Mischen) + 0,25 cm³ Amylalkohol (Mischen).
4. Reaktion nach *Baudisch*: 1,0 cm³ Indollösung + 0,5 cm³ Kalilauge (10 %ig) — Nitromethan (0,5 %ig) — Gemisch; Aufkochen; + 0,5 cm³ Amylalkohol (Mischen) + konzentrierte Salzsäure im Ueberschuss.

Dabei ergab sich folgendes:

Tabelle 2.

Reaktion nach	Indol, gelöst in destilliertem Wasser	Indol, gelöst in Peptonwasser
*Morelli**)	1 : 1 200 000 +	1 : 1 200 000 +
	1 : 1 500 000 ±	1 : 1 500 000 bis 1 : 2 000 000 ±
Salkowski - Kitasato	1 : 4 000 000 +	1 : 1 500 000 +
	1 : 8 000 000 ±	1 : 2 000 000 ±
Ehrlich-Böhme . .	1 : 8 000 000 +	1 : 1 000 000 +
	1 : 10 000 000 ±	1 : 2 000 000 —
Baudisch	1 : 600 000 +	1 : 400 000 +
	1 : 800 000 bis 1 : 1 000 000 ±	1 : 600 000 bis 1 : 1 000 000 ±

*) Beobachtung nach 24 Stunden bei 37° C.

Die Reaktion nach *Morelli* zeigte nach 3 resp. 10 Tagen noch höhere Verdünnungsgrade an:

Tabelle 2 a.

	Indol, gelöst in destilliertem Wasser	Indol, gelöst in Peptonwasser
Nach 3 Tagen	1 : 4 000 000 +	1 : 4 000 000 +
	1 : 8 000 000 ±	1 : 8 000 000 ±
Nach 10 Tagen	1 : 8 000 000 ±	1 : 8 000 000 ±
Bei Betrachtung im auffallenden Licht	1 : 3 000 000 +	1 : 3 000 000 +
	1 : 4 000 000 —	1 : 4 000 000 —

Bei dieser Zusammenstellung lassen sich nur einerseits die *Morelli*'sche und *Salkowski-Kitasato*'sche und andererseits die *Ehrlich-Böhme*'sche und *Baudisch*'sche Reaktion unmittelbar miteinander vergleichen, indem für die ersteren beiden 10 mal grössere Mengen von Indollösung verwendet wurden. Hätte man bei grösstmöglicher Reduktion des Amylalkoholquantums die Mengen der übrigen reagierenden Flüssigkeiten 10 mal grösser gewählt, so hätte sich wohl die Empfindlichkeit der letzten beiden Reaktionen noch etwas steigern lassen, doch ist dabei zu berücksichtigen, dass infolge der Löslichkeit des Amylalkohols in Wasser (2,5 Gewichtsprozent bei 16,5°) ein Teil des entstehenden Farbstoffes aus diesem nicht extrahierbar ist, der sich mit der Steigerung der Menge der Indollösung proportional auch vergrössert. Wir sind in obiger Zusammenstellung bei der Notierung einer positiven Reaktion (+) bis zur äussersten Grenze gegangen, da die Entscheidung über den Ausfall der Reaktion andernfalls zu sehr vom subjektiven Ermessen abhängt. ± bedeutet also bereits fraglichen Ausfall der Probe.

Da auch *Buard* eine auf Indol-Aldehyd-Kondensation beruhende Reaktion in Vorschlag gebracht hat, die an Empfindlichkeit der *Ehrlich-Böhme*'schen nicht nachstehen soll, wobei er als Aldehyd das Vanillin (Methylprotocatechualdehyd, $C_6H_3[OCH_3]OH\text{-}C^{O}_{H}$) verwendet, so schien es uns von Interesse zu sein, auch diese nachzuprüfen. Sie wurde einerseits nach Angabe dieses Autors ausgeführt, andererseits mit einer 10 mal stärkeren Vanillinlösung in Anlehnung an die Angaben von *Denigès*:

1. 10 cm³ wässerige Indollösung + 5,5 cm³ Alkohol (96 %ig); Mischen; + 1 cm³ alkoholische Vanillinlösung, 0,02 %ig + 3 cm³ konzentrierte Salzsäure *(Buard)* oder
2. abgesehen von der Benützung von 1 cm³ 0,2 %iger alkoholischer Vanillinlösung dasselbe *(Denigès)*.

Wie die folgende Tabelle zeigt, erwies sich diese Reaktion tatsächlich der *Ehrlich-Böhme*'schen an Empfindlichkeit sogar etwas überlegen.

Tabelle 3.

Indol-Lösung, Verdünnung 1/...	Alkoholische Vanillin-Lösung 0,02/100										Ehrlich-Böhme*)		
	5 Minuten		15 Minuten		30 Minuten		1 Stunde		20 Stunden		ohne Amylalkohol		mit Amylalkohol
	h	v	h	v	h	v	h	v	h	v	h	v	
10 000	Rosa-schimmer	Eosin-rosa	Rosa-schimmer	Rosa-orange	Rosa-schimmer	Orange	Eosinrosa	Granat-rot	Magenta-rot	Tief magentarot	Hochrot	Dunkel-kirschrot	Tief kirschrot
100 000	»	»	»	Eosinrot	»	Eosinrot	»	Eosinrot	Schwach magentarot	Magenta-rot	Kirschrot bis rosa	Stark kirschrot	Kirschrot
1 000 000	—	Rosa-schimmer	»	Rosa	»	Rosa	Rosa-schimmer	Eosinrosa	Magenta-rotschimmer	Magenta-rosabräunlich	Schwach rosa	Hochrot	Rosa
2 000 000	—	»	»	»	»	»	»	Rosa	—	Rosa	Rosa-schimmer	Rosa	»
3 000 000	—	»	»	»	»	»	»	»	—	»	—	Schwach rosa	Rosa-schimmer
4 000 000	—	»	—	Rosa-schimmer	»	Rosa-schimmer	»	Rosa-schimmer	—	Rosa-schimmer	—	Rosa-schimmer	—
6 000 000	—	»	—	»	—	»	—	»	—	»	—	»?	—
8 000 000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10 000 000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12 000 000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
14 000 000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
16 000 000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

*) Wir benützten bei diesem Versuch als Ausgangslösung die gleiche 1‰ige Indollösung, welche im vorhergehenden in Verwendung kam, bei deren Herstellung wir durch 5 Minuten langes Erwärmen auf 60° C. und folgendes Schütteln eine vollkommene Auflösung des Indols erzielten. (*Rocek* macht über die Löslichkeit von Indol im Wasser die Angabe, dass sie bei 20° C. ca. 1 : 500 beträgt, aber nur in dem Falle, dass alkoholische Indollösung zum Wasser unter fortwährendem Schütteln tropfenweise zugesetzt wird.) Diese Lösung wurde unter Glasstopfenverschluss im Dunkeln bei Zimmertemperatur einige Tage aufbewahrt und dann nach abermaligem Schütteln für den vorliegenden Versuch gebraucht, da an ihr weder Trübung noch sonstige Veränderungen festzustellen waren. Dessenungeachtet dürfte eine teilweise Zersetzung des Indols eingetreten sein, womit sich die in diesem Versuche zutage getretene (scheinbare) geringere Empfindlichkeit der *Ehrlich-Böhme*'schen Reaktion erklären würde. Da es uns bei der Beurteilung der *Buard*'schen Reaktion nur auf Vergleichswerte ankam und diese Reaktion nicht weiter berücksichtigt wurde, so sahen wir von einer Wiederholung dieses Versuches mit frischer Indollösung ab.

Tabelle 3a.

Indol-Lösung Verdünnung 1/...	Alkoholische Vanillin-Lösung 0,2/100									
	5 Minuten		15 Minuten		30 Minuten		1 Stunde		20 Stunden	
	h	v	h	v	h	v	h	v	h	v
10 000	Eosinrot	Granatrot	Granatrot	Tief granatrot	Granatrot	Tief granatrot	Granatrot	Tief granatrot	Tief magentarot	Tief magentarot
100 000	»	Intensiv eosinrot	Eosinrot	Tief eosinrot	Eosinrot	Granatrot	Eosinrot	Granatrot	Hell magentarot	»
1 000 000	Rosa	Eosinrot	Rosa	Eosinrot	Rosa	Eosinrot	Rosa	Eosinrot	Magentarot-schimmer	Magentarot
2 000 000	»	»	»	»	»	»	»	»	»	Eosinrosa
3 000 000	Rosa-schimmer	Eosinrosa	Rosa-schimmer	Eosinrosa	Rosa-schimmer	Eosinrosa	Rosa-schimmer	Eosinrosa	» ?	Rosa
4 000 000	»	»	»	»	»	»	»	»	—	»
6 000 000	—	Rosa	—	Rosa	—	Rosa	—	Rosa	—	Rosa-schimmer
8 000 000	—	Rosa-schimmer	—	Rosa-schimmer	—	Rosa-schimmer	—	Rosa-schimmer	—	»
10 000 000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Zeichenerklärung für Tabelle 3 und 3a:

h = horizontale Betrachtung; v = vertikale Betrachtung; — = negativer Ausfall der Reaktion.

Ein Nachteil derselben besteht in dem Fehlen eines Extraktionsmittels für den gebildeten Farbstoff. Vorausgesetzt, dass die Reaktion für Indol spezifisch ist, kann dieser Umstand nicht allzu sehr ins Gewicht fallen, wenn die Kulturflüssigkeit in hoher Schicht vertikal von oben gegen einen weissen Hintergrund beobachtet wird. Wesentliche Vorteile gegenüber der *Ehrlich-Böhme*'schen Reaktion bietet die *Buard*'sche Probe, abgesehen von der grösseren Wohlfeilheit und besseren Beschaffbarkeit der Reagenzien, indessen kaum.

An Hand einer Anzahl von Kulturversuchen mit Hülfe der gebräuchlichen, leicht und ohne besondere Kosten herzustellenden flüssigen Nährmedien sollte nun eruiert werden, ob sich die äusserst einfache *Morelli*'sche Reaktion an Leistungsfähigkeit den üblichen Indolproben gleichstellen lässt. Als Versuchsorganismen verwendeten wir eine Reihe von aus Abwasser oder Fäkalien gezüchteten, kulturell-biologisch charakterisierten *Colistämmen*, sowie einige dem *Bact. coli* nahestehende Organismen. Die Impfung erfolgte, wo nichts anderes bemerkt wird, von 24stündigen, bei 37° C. aufgestellten Agaroberflächenkulturen mittels kleiner Oese. Für die Herstellung der Nährmedien wurde in der Regel «Peptonum siccum» *Witte-Rostock* verwendet, das für diesen Zweck unter verschiedenen Peptonpräparaten besonders geeignet sein dürfte. Später waren wir aus äusseren Gründen gezwungen, uns anderer Präparate zu bedienen, nämlich des Peptons *Byla* und des Peptons «Bern». Die Kulturflüssigkeit wurde zu 10 cm³ in Reagensröhrchen abgefüllt. Die Kulturen standen während der Versuchsdauer bei 37° C.

1. Versuch.

Nährsubstrat: Als solches dient ein Peptonwasser folgender Zusammensetzung:

Leitungswasser	1000 cm³
Pepton *Witte*	10,0 g
Kochsalz	5,0 g
Kaliumnitrat	0,1 g
Kristall. Soda	0,2 g

Versuchsorganismen: Sie stammen aus Abwasser. Es sind *Coli*bakterien mit und ohne Indolbildungsvermögen, von denen sich «I S» als *Grascoli*, «I U» und «I Z» als *Bact. coli imperfectum*, «I X» als *Bact. coli mutabile* noch näher charakterisieren liessen. «I W» ist ein *Bact. lactis aërogenes*, «I Y» gehört zu der Gruppe der (Gelatine verflüssigenden, gelben) *Mehlcoli*.

Bemerkungen zur Ausführung der Reaktionen und den in Tabellen 4 und 5 wiedergegebenen Versuchsresultaten: Von einer besonderen Sterilisierung der für die Reaktion nach *Morelli* notwendigen Oxalsäurepapierstreifen haben wir abgesehen, nachdem sich ergeben hatte, dass dieselben bei Behandlung im Autoklaven äusserst brüchig werden, bei trockener Sterilisation (1 Stunde bei 120° C.) aber verkohlen. Wenn die Streifen nach dem Eintauchen in die kochende konzentrierte Oxalsäurelösung zur Aufbewahrung und eventuellen

Tabelle 4.

Indolreaktion nach *Morelli*.

Coli-stämme	Trockene Oxalsäurestreifen										Feuchte Oxalsäurestreifen									
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	5. Tag	7. Tag	10. Tag	15. Tag	20. Tag	30. Tag	40. Tag	1. Tag	2. Tag	3. Tag	5. Tag	7. Tag	10. Tag	15. Tag	20. Tag	30. Tag	40. Tag
I A	—	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	—	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
I B	—	—	—	+	++	++	++	+++	+++	+++	—	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
I C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I D	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I E	—	+	+	+	++	++(+)	+++	+++	+++	+++	—	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++
I F	—	+	+	+	++	++	++	++	++	++	—	+	+	+	+	+	++	++	+++	+++
I G	—	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	—	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
I H	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I J	—	+	+	+	++	++(+)	+++	+++	+++	+++	—	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++
I K	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I L	—	—	+	+	++	++(+)	+++	+++	+++	+++	—	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++
I M	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I N	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I O	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I P	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I Q	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I R	—	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
I S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I T	—	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
I U	—	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
I V	—	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
I W	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I X	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I Y	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I Z	—	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	—	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++

Zeichenerklärung für Tabellen 4 bis 7.

Morelli:
— = weiss; ++ = rosa;
+ = schwach rosa; +++ = dunkelfleischrot.

Salkowski-K. und *Ehrlich-B.:*
— = ohne Verfärbung;
+ = Rosafärbung
++ = Rotfärbung
+++ = intensive Rotfärbung
} mit Amylalkohol (resp. Chloroform) extrahierbar

Tabelle 5.

Coli-stämme	Indolreaktion nach Salkowski-Kitasato										Indolreaktion nach Ehrlich-Böhme									
	1.Tag	2.Tag	3. Tag	4. Tag	6. Tag	8. Tag	10.Tag	15.Tag	23.Tag	30.Tag	1.Tag	2.Tag	3.Tag	5. Tag	7. Tag	10.Tag	15.Tag	20.Tag	30.Tag	40.Tag
I A	+	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	—	—	—	+	+	++	++	++	++	++
I B	+	(+)	(+)	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	—	—	—	(+)	(+)	+	++	—	+	+
I C	—	—	—	—	—	—	—?	—?	—?	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I D	—	—	—	—	—	—?	—?	—?	—?	—?	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I E	+	+	++	++	++	++	++	+++	++	+++	—	—	—	(+)	(+)	+	+	—	+	—
I F	+	+	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I G	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	—	—	—	(+)	(+)	+	+	(+)	(+)	—
I H	—	—	—	—	—	—?	—	—?	—	—?	—	—	—	—	—	—	—	—?	—	—
I J	+	+	+	++	++	++	++	++	+++	+++	—	—	—	—	—	—	(+)	—	(+)	—
I K	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I L	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	—	—	—	(+)	—	—	+	(+)	+	—
I M	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I N	—	—	—	—	(+)?	+?	—?	—?	—?	—?	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I O	—	—	—	—	—	—	—	—?	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I P	—	—	—	—	—	—	—	—?	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I Q	—	—	—	—	+?	+?	—?	—?	—?	—	—	—	—	—	—	—	—	—?	—	—
I R	++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	—	—	+	+	++	++	+	(+)	(+)
I S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—?	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I T	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++++	+++	—	—	—	+	+	++	++	++	+	++
I U	++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++++	+++	—	—	—	+	+	++	++	+	+	+
I V	++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	—	—	+	+	+	++	++	(+)	—
I W	—	—	+	—	—?	+?	+	—?	—?	—?	—	—	—	—	—	—	(+)	(+)	—	+
I X	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I Y	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I Z	(+)	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	(+)	—	—	—	+	(+)	+	++	+	+	+

Trocknung so in sterile Petridoppelschalen gelegt werden, dass das nicht imprägnierte Ende daraus hervorragt, so kann von einer grossen Infektionsgefahr nicht die Rede sein. Die Trocknung fand bei 46° C. statt, wobei die Schalen ganz wenig geöffnet waren. — Das erste Auftreten einer positiven Reaktion liess sich am schärfsten bei Betrachtung im durchfallenden Licht und Vergleichung mit einer negativen Kontrolle feststellen. Es dokumentiert sich als eine schmutzige Verfärbung des Papierstreifens, die nach Verlauf einiger Stunden einem deutlichen Rosaton weicht. Dieser wird während der folgenden Tage intensiver, so dass schliesslich ein dunkles Fleischrot resultiert.

Die Reaktion nach *Salkowski-Kitasato* wurde nach den Angaben von *Lehmann* und *Neumann* ausgeführt: Versetzen der Kultur mit 2 bis 3 cm³ Amylalkohol und Schütteln; Zusatz von 5 cm³ 10%iger Schwefelsäure und Erwärmen auf 80° C. Bei ausbleibender Rotfärbung des Amylalkohols allmählicher Zusatz von 0,5 bis 2,0 cm³ 0,05%iger Natriumnitritlösung bis zum Maximum der Reaktion. — Bei sämtlichen nach einem Tage als positiv vermerkten Kulturen trat die Rotfärbung ohne Nitritzusatz auf. Am 3. Tage reagierte auch «I W» positiv und zwar ebenfalls ohne Nitritzusatz. Am 6. Tage ergaben ferner die Stämme «I N» und «I Q» eine schwache positive Reaktion, indem sich die Amylalkoholschicht schwach rosa verfärbt erwies, bei «I N» erst nach Zusatz von Nitrit, bei «I Q» schon vorher. Auffallend ist aber der Umstand, dass die unter der Amylalkoholschicht stehende Peptonwassersäule bedeutend stärker rot war. Am 10. Tage ergibt wieder Stamm «I W» eine deutlich positive Reaktion, doch ist die Peptonwasserschicht ebenso stark rot gefärbt wie die Amylalkoholschicht. Am 15. Tage zeigten die Stämme «I C», «I D», «I H», «I N», «I O», «I P», «I Q» und «I W» bereits vor dem Nitritzusatz ganz schwache Rotfärbung der Amylalkoholschicht. Sie ist aber auch nach dem Nitritzusatz nicht intensiver geworden als diejenige der Peptonwasserschicht.

Die Reaktion nach *Ehrlich-Böhme* wurde nach *Böhme's* Vorschrift ausgeführt mit der Abweichung, dass an Stelle von Kaliumpersulfat Natriumpersulfat verwendet und dessen konzentrierte wässerige Lösung vor der Dimethylamidobenzaldehydlösung zur Kulturflüssigkeit gesetzt wurde.

Zusammenfassung der Versuchsergebnisse:

1. Die Empfindlichkeit der Reaktion nach *Morelli* wird etwas erhöht durch Verwendung feuchter Oxalsäurepapierstreifen statt trockener.
2. Die *Salkowski-Kitasato*'sche Reaktion hat sich bezüglich Raschheit der Erzielung positiver Ergebnisse etwas empfindlicher erwiesen als die Probe nach *Morelli*.
3. Jene gibt aber öfters zweifelhafte Resultate, was bei dieser nicht der Fall ist.
4. Die als schärfste Indolprobe geltende *Ehrlich-Böhme*'sche Reaktion hat sich in diesem Versuch auffallenderweise als am wenigsten empfindlich erwiesen.

2. Versuch.

Selter empfiehlt als geeignetsten Nährboden für den Indolnachweis ein Peptonwasser folgender Zusammensetzung:

Wasser	1000 cm³
Peptonum siccum *Witte*	100,0 g
Natriumphosphat	5,0 g
Magnesiumsulfat	1,0 g [1])

Es war deshalb von Interesse, die drei Reaktionen bezüglich ihrer Leistungsfähigkeit auch an Hand solcher Kulturen zu vergleichen. Als Versuchsorganismen kam eine Anzahl der im vorhergehenden Versuche benützten in Verwendung. Die Ausführung der Reaktionen blieb dieselbe. Die Versuchsresultate sind in Tabelle 6 enthalten.

Tabelle 6.

Coli-stämme	Nach 1 Tag			Nach 2 Tagen			Nach 14 Tagen			Nach 23 Tagen	
	Morelli	Salkowski	Ehrlich	Morelli	Salkowski	Ehrlich	Morelli	Salkowski	Ehrlich	Morelli	Salkowski
I A	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
I B	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
I C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I D	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I E	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
I F	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
I G	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
I J	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
I L	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
I R	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
I Y	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I Z	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Bei der Reaktion nach *Salkowski-Kitasato* trat diesmal bei den ein- und zweitägigen Kulturen eine Rotfärbung erst nach Zusatz einiger Tropfen Nitritlösung auf. Nach 14 resp. 23 Tagen entstand bei dieser Probe auch bei den beiden Stämmen «I C» und «I D» eine Rosa- resp. Rosaviolettfärbung. Infolge des Schüttelns bildet die Amylalkoholschicht vorerst eine Emulsion; die Rosafärbung teilte sich auch dieser mit. Erst beim Klarwerden der Amylalkoholschicht zeigte es sich dann, dass der Amylalkohol farblos geblieben war. Bei einigen positiven Stämmen erschien das Rot der Peptonwasserschicht kaum weniger intensiv als dasjenige der Amylalkoholschicht.

[1]) Bezüglich der Herstellung gibt *Selter* an: «Zur Bereitung dieser letzteren Nährböden wurde das Pepton mit den Salzen im Wasser etwa ½ Stunde gekocht, filtriert und im Reagensröhrchen sterilisiert».

Zusammenfassung der Versuchsergebnisse:

1. Wird statt 1%igem 10%iges Peptonwasser verwendet, so lässt sich das Indol mittels der Reaktion nach *Morelli* ebenso rasch nachweisen wie nach *Salkowski-Kitasato* und *Ehrlich-Böhme*.
2. Bei diesem hohen Peptongehalt bildet sich in positiven älteren Kulturen bei der *Salkowski-Kitasato'*schen Reaktion oft so viel Nitrosoindol, dass die wässerige Kulturschicht sich so stark gefärbt erweist wie die 2 bis 3 cm³ Amylalkohol.
3. Die Probe nach *Ehrlich-Böhme* erwies sich zum mindesten als ebenso leistungsfähig wie die beiden andern.

3. Versuch.

In Anbetracht des relativ hohen Preises des Peptons schien es wünschbar, zu prüfen, ob sich ein 5%iges Peptonwasser für die gleich rasche Ermittlung indolbildender *Coli*stämme nicht ebensogut eigne wie das 10%ige. Es hatte folgende Zusammensetzung:

Wasser	1000 cm³	Magnesiumphosphat . .	1,0 g
Pepton *Witte* . . .	50,0 g	Natriumsulfat	5,0 g

Dabei kamen die gleichen Organismen wie im vorhergehenden Versuch zur Verwendung. Die Reaktion nach *Salkowski-Kitasato* wurde in der Modifikation von *Conradi* und *Bierast* ausgeführt, indem wir 10 cm³ Kultur mit 1 cm³ frisch bereiteter 0,005%iger Kaliumnitritlösung und 1 cm³ 25%iger Schwefelsäure versetzten. Nach der Mischung blieben die Röhrchen eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur stehen. Dann wurde mit 2 bis 3 cm³ Amylalkohol extrahiert. Das Ergebnis war folgendes:

Tabelle 7.

Colistämme	Nach 1 Tag		Nach 2 Tagen		Nach 10 Tagen	
	Morelli	Salkowski	Morelli	Salkowski	Morelli	Salkowski
I A	+	++	++	++	+++	+++
I B	+	++	++	++	+++	+++
I C	—	—	—	—	—	—
I D	—	—	—	—	—	—
I E	+(+)	++	++	++	+++	+++
I F	+(+)	++	++	++	+++	+++
I G	++	++	++	++	+++	+++
I J	++	++	++	++	+++	+++
I L	++	++	++(+)	++	+++	+++
I R	++	++	++(+)	++	+++	+++
I Y	—	—	—	—	—	—
I Z	++	++	++	++	+++	+++

Bei den positiv reagierenden 10tägigen Kulturen zeigte die Reaktion nach *Salkowski-Kitasato* ein eigenartiges Verhalten: Nach Zusatz der Reagenzien trat die Rotfärbung vorerst rasch ein, um aber nach 15 bis 20 Minuten langem Stehen wieder zu verblassen, so dass dann das nach 30 Minuten vorgenommene Ausschütteln mit Amylalkohol bei allen positiven Stämmen ein negatives Resultat ergab. Nach einer Erwärmung der Röhrchen auf 50 bis 60° C. im Wasserbad trat indessen bei den positiven Kulturen in der Amylalkoholschicht wieder Rotfärbung auf, was bei den negativen nicht der Fall war. Wir sind der Ursache dieser Erscheinung nicht nachgegangen, doch könnte sie nach unserem Dafürhalten in einer Störung des für die Reaktion richtigen Mengenverhältnisses zwischen Nitrit und Indol liegen, so zwar, dass sich einerseits in den 10tägigen Kulturen schon vor Zusatz der Nitritlösung eine gewisse Menge von durch die Organismen gebildetem Nitrit (herstammend aus einer Nitratverunreinigung der für die Peptonwasserbereitung verwendeten Chemikalien oder — was zwar nach der Arbeit von *Bleisch* fraglich, gemäss den Befunden von *Mazzetti* aber als wohl möglich erscheint — aus dem Pepton) vorfand, andererseits aber ein Zurückgehen der Indolmenge infolge von Verdunstung statthatte, so dass sich dann eine für die Entstehung des Nitrosoindols zu grosse Nitritmenge ergab. Bei einer höheren Temperatur aber könnte eine Verschiebung dieses optimalen Mengenverhältnisses zwischen Nitrit und Indol für die Nitrosoindolbildung stattfinden, so dass dann die Reaktion wieder positiv wird.

Zusammenfassung der Versuchsergebnisse: Auch bei Verwendung 5 %igen Peptonwassers tritt bei den indolbildenden Organismen die Reaktion nach *Morelli* ebenso rasch in die Erscheinung wie diejenige nach *Salkowski-Kitasato.*

Da für uns unter den indolbildenden Mikroorganismen das *Bact. coli* das grösste Interesse beansprucht, hielten wir es für notwendig, zu prüfen, ob sich der Parallelismus zwischen der Probe nach *Morelli* und *Salkowski-Kitasato* an einer weiteren grösseren Anzahl solcher Kleinwesen ebenfalls nachweisen lasse. Wir benutzten dazu *Coli*stämme, die teils aus Abwasser, teils aus menschlichen Fäzes gezüchtet worden waren. Die *Salkowski-Kitasato*-Reaktion wurde nach *Conradi* und *Bierast* bei Züchtung in 1 %igem Peptonwasser (Pepton *Witte*) ausgeführt. Wir gelangten zu folgenden Resultaten:

4. Versuch.

1. Von 22 *Coli*typen aus Abwasser ergaben nach 20 Tagen 5 eine sehr starke *Morelli*-Reaktion. Von diesen reagierten stark nach *Salkowski-Kitasato* 3, sehr stark 2. Sämtliche übrigen verhielten sich bei beiden Proben negativ.

2. 40 *Coli*typen aus menschlichen Fäzes zeigten nach 7 Tagen eine sehr starke *Morelli*- und eine starke *Salkowski-Kitasato*-Reaktion.

3. 15 *Coli*typen aus menschlichen Fäzes wiesen nach 6 Tagen eine sehr starke *Morelli*-Reaktion und eine starke *Salkowski-Kitasato*-Reaktion auf.

4. 10 *Coli*typen aus menschlichen Fäzes ergaben nach 9 Tagen eine sehr starke *Morelli*-Reaktion und eine starke *Salkowski-Kitasato*-Reaktion.

5. 25 *Coli*typen aus menschlichen Fäzes zeigten nach 6 Tagen eine starke *Morelli*-Reaktion. Nach *Salkowski-Kitasato* trat zunächst nach Zusatz der Reagenzien keine Rotfärbung auf, diese stellte sich bei 19 Stämmen erst ein nach Erwärmung auf 80° C. Sie war von mittlerer Intensität. 6 Stämme aber verhielten sich auch dann negativ.

6. 40 *Coli*typen aus menschlichen Fäzes reagierten nach 12 Tagen nach *Morelli* sehr stark positiv. Sämtliche erwiesen sich auch nach *Salkowski-Kitasato* als Indolbildner. Doch fiel die Reaktion nur bei 15 sehr stark positiv aus, bei 16 war sie von mittlerer Intensität, bei 9 schwach.

7. 30 *Coli*typen aus menschlichen Fäzes ergaben nach 25 Tagen eine sehr starke *Morelli*-Reaktion, die eine Hälfte eine sehr starke, die andere eine starke *Salkowski-Kitasato*-Reaktion.

Zusammenfassung der Versuchsergebnisse:

1. Von weiteren 182 *Coli*typen haben sich 17 sowohl nach der *Morelli*-, als auch nach der *Salkowski-Kitasato*-Reaktion als Nichtindolbildner erwiesen, 6 verhielten sich nach *Salkowski-Kitasato* negativ, währenddem die *Morelli*-Reaktion stark positiv ausfiel, die übrigen 159 verhielten sich nach beiden Proben positiv;
2. Eine Uebereinstimmung der beiden Reaktionen war also festzustellen in 96,7%, in 3,3% hat die *Salkowski-Kitasato*-Reaktion versagt;
3. Die Reaktion nach *Morelli* darf also bezüglich der *Coli*gruppe als zuverlässige Indolreaktion bezeichnet werden.

Da es beim Nachweis von indolbildenden Mikroorganismen meistens von Wichtigkeit ist, möglichst frühzeitig über ihr diesbezügliches Verhalten Gewissheit zu erlangen, so hielten wir es für notwendig, uns in dieser Hinsicht über den Ausfall der *Morelli*-Reaktion noch etwas näher zu orientieren. Im ersten Versuch, wo 1%iges Peptonwasser verwendet wurde, hat sie die gleichen Indolbildner, welche von der *Salkowski-Kitasato*-Reaktion nach 24 Stunden als solche angezeigt wurden, erst einen Tag später nachgewiesen. Es liegt in der Eigenart dieser Reaktion, deren positiver Ausfall ja von dem Entweichen des Indols in Dampfform aus der wässerigen Kulturlösung abhängt, dass gerade hier punkto Raschheit des Eintretens sich Bedenken geltend machen mussten.

Wir haben zum Vergleich die Reaktion nach *Baudisch* herangezogen, da sie der Autor gerade im Hinblick auf ihre Tauglichkeit als Frühdiagnostikum empfohlen hat. Als Nährmedium benutzten wir ein nach dem im ersten Versuch angegebenen Rezept hergestelltes Peptonwasser, wobei aber statt Pepton *Witte* ein Pepton *Byla* französischer Herkunft verwendet wurde. Die Kulturflüssigkeit wurde diesmal zu je 8 cm³ abgefüllt. Die Impfung erfolgte von 24 Stunden bei 37° C. gestandenen *Byla*peptonwasserkulturen, wobei nach Mischen der Kultur je 3 mittelgrosse Oesen übertragen wurden.

Die *Baudisch*-Reaktion führten wir mit 1 cm³ Kultur und 0,5 cm³ Kalilauge-Nitromethangemisch in der früher angegebenen Weise aus. In den folgenden Tabellen 8 und 9 sind die Versuchsresultate wiedergegeben.

Tabelle 8.

Coli-stämme	Nach 7½ Stunden		Nach 17 Stunden		Nach 24 Stunden		Nach 48 Stunden	
	Morelli	Baudisch	Morelli	Baudisch	Morelli	Baudisch	Morelli	Baudisch
I A	+	+	+	+++	+	+++	+(+)	++
I B	—	(+)	+	+++	+	+++	+(+)	+++
I C	—	—	—	—	—	—	—	—
I D	—	—	—	—	—	—	—	—
I E	+	+++	+	++	+	+++	+(+)	++
I F	+?	++	+	++	+	+++	+(+)	++
I G	—	+++	+	+++	+	+++	+(+)	+++
I J	—	++	+	++	+	+++	+(+)	++
I L	+	+++	+	+++	+	+++	+(+)	++
I R	+	+	+	+++	+	+++	+(+)	++
I Y	—	—	—	—	—	—	—	—
I Z	+	+++	+	+++	+	+++	+(+)	++

Zusammenfassung der Versuchsergebnisse:

1. Die *Morelli*-Reaktion gibt bei Beobachtung der Oxalsäurepapierstreifen im durchfallenden Licht und Gegenüberstellung einer negativen Kontrolle bezüglich Raschheit des Indolnachweises annähernd gleich gute Resultate wie die Probe nach *Baudisch*.
2. Sie hat bei Verwendung von 1%igem *Byla*peptonwasser und einer Bebrütungszeit von 13 Stunden bei 4 *Coli*stämmen mit der *Baudisch*-Reaktion übereinstimmende Ergebnisse geliefert, wobei der Ausfall der Reaktion jeden Zweifel ausschloss;
3. Von den Indolbildnern unter diesen 4 Stämmen konnte der eine nach *Morelli* aber schon nach 5 Stunden, ein anderer nach 6, der dritte nach 9 Stunden als solcher erkannt werden.
4. Die *Morelli*-Reaktion hat bei einer Bebrütungszeit von 17 Stunden bei im übrigen gleichen Versuchsbedingungen 12 *Coli*stämme in mit der *Baudisch*-Probe übereinstimmender und eindeutiger Weise als Indol- resp. Nichtindolbildner charakterisiert.

Es blieb nun noch das Verhalten der *Morelli*-Reaktion nachzuprüfen bei Verwendung eines mit solchen Substanzen versetzten Peptonwassers, die als Verunreinigungen in dieser Kulturflüssigkeit vorkommen, und welche die Indolbildung oder den Indolnachweis in den Kulturen mehr oder weniger stören können. So hat schon *Bleisch* auf den schädigenden Einfluss eines

Tabelle 9.

Nach	Reaktion	I A	I B	I E	I C
1 Stunde *	Morelli	—	—	—	—
	Baudisch	—	—	—	—
2 Stunden **	Morelli	—	—	—	—
	Baudisch	—	—	—	—
3 Stunden	Morelli	—	—	—	—
	Baudisch	(+)	—	+	—
4 Stunden	Morelli	—	—	—?	—
	Baudisch	+	—	+++	—
5 Stunden	Morelli	—?	—	(+)	—
	Baudisch	++	(+)	+++	—
6 Stunden	Morelli	(+)	—	+	—
	Baudisch	++	+(+)	+++	—
7 Stunden	Morelli	(+)	—	+	—
	Baudisch	+++	+(+)	+++	—
8 Stunden	Morelli	+	—?	+	—
	Baudisch	+++	+(+)	++	—
9 Stunden	Morelli	+	(+)	+	—
	Baudisch	+++	++	+++	—
10 Stunden	Morelli	+	(+)	+(+)	—
	Baudisch	+++	++	+++	—
11 Stunden	Morelli	+	(+)	+(+)	—
	Baudisch	+++	++	+++	—
13 Stunden	Morelli	+(+)	+(+)	+(+)	—
	Baudisch	++	+++	++	—
14 Stunden	Morelli	+(+)	+	+(+)	—
	Baudisch	++	+++	++	—
15 Stunden	Morelli	+(+)	+	+(+)	—
	Baudisch	++	+++	++	—
16 Stunden	Morelli	+(+)	+	+(+)	—
	Baudisch	++	+++	++	—
17 Stunden	Morelli	+(+)	+	+(+)	—
	Baudisch	++	+++	++	—
18 Stunden	Morelli	+(+)	+	+(+)	—
	Baudisch	++	+++	++	—
20 Stunden	Morelli	+(+)	+	+(+)	—
	Baudisch	++	+++	+++	—
24 Stunden	Morelli	+(+)	+	+(+)	—
	Baudisch	++	+++	++	—

* Peptonwasser sämtlicher Kulturen klar.

** Peptonwasser bei I A schwach, bei I B, I E und I C sehr schwach getrübt.

Zeichenerklärung für die Tabellen 8 und 9:

Morelli: — = weiss; (+) = Rosaschimmer; + = schwach rosa; +(+) = rosa.

Baudisch: — = ohne Verfärbung; (+) = Rosaschimmer; + = blassrosa; ++ = hellkirschrot oder granatrot; +++ = kirschrot.

zu hohen Gehaltes an Nitraten und Nitriten aufmerksam gemacht. *Selter, Gorini, de Graaff* fanden, dass bei Anwesenheit von 0,2 resp. 0,5 oder 1% Traubenzucker Indolbildung nicht mehr statthatte. Auch *Zipfel* stellte fest, dass bei *Coli*kulturen in 3%igem Peptonwasser mit Zusatz von 0,5, 1 und 1,5% Traubenzucker die Nitrit- und die Aldehydreaktion negativ ausfiel, während sich andererseits die Nitroprussidnatriumreaktion schwach positiv erwies und das Oxalsäurepapier nach Verlauf von 48 Stunden schwach rosa verfärbt war. Benutzte dieser Autor aber statt der Pepton- eine Tryptophannährlösung, so konnte er beim obigen Traubenzuckergehalt keine merkliche Abschwächung der Reaktionen beobachten. In neuester Zeit haben *Herzfeld* und *Klinger* an Hand einer für den quantitativen Nachweis von Tryptophan und Indol ausgearbeiteten kolorimetrischen Methode, bei der als Reagens der p-Dimethylaminobenzaldehyd in Verwendung kommt, den Nachweis erbracht, dass die Indolbildung durch *Bact. coli* in einer Peptonsalzlösung bei einem Gehalt der letzteren von 0,5% einer beliebigen Zuckerart bei 28stündiger Bebrütung vollständig ausbleibt, während in einer Tryptophansalzlösung (die ausser dem im Tryptophan vorhandenen keinen Stickstoff enthielt) mit 0,5% Traubenzucker bei 18stündiger Bebrütung eine weitgehende Hemmung der Indolbildung festzustellen war, wogegen bei einem gleichen Gehalt an Milchzucker die Indolbildung ungestört von statten ging. -- *Morelli* macht in bezug auf sein Verfahren die Angabe, «dass verschiedene Mikroorganismen (z. B. *Vibrio Metschnikoff*) Indol aus der Milch bilden können, einem Nährboden, bei dem durch andere Methoden der Nachweis nicht möglich ist». Ebenso gelang es ihm, «die Indolreaktion auch bei traubenzuckerhaltigen Substraten hervorzurufen, d. h. bei solchen, wo überhaupt eine Indolbildung für gar nicht möglich gehalten wurde». Als Vorbedingung für das «recht deutliche» Zustandekommen der Reaktion unter solchen Verhältnissen betrachtet er aber doch auch die vorhergehende Zerstörung des Traubenzuckers durch den Mikroorganismus.

Uns kam es lediglich darauf an, zu eruieren, ob sich diese verunreinigenden Substanzen gegenüber den verschiedenen Methoden des Indolnachweises in gleich starker Weise störend geltend machen und bei welchem Gehalte des 1%igen Peptonwassersubstrates an ihnen der Nachweis gänzlich missglückt. Die folgenden Tabellen 10 und 11 geben darüber Auskunft.

6. Versuch.

Als Kultursubstrat verwendeten wir:

Aqua dest.	1000,0
Pepton *Byla*	12,0
Kochsalz	5,0
Krist. Soda	0,2

zu je 9 cm³ in Reagensröhrchen abgefüllt. Sämtliche Komponenten der Kulturflüssigkeit hatten sich als nitrat- und nitritfrei erwiesen. Das Pepton enthielt keinen Traubenzucker.

Tabelle 10.

Nach 1 Tag.

Reaktion	Nitrat				Nitrit				Dextrose				Ohne Zusatz	
	0,0001 %	0,001 %	0,01 %	0,1 %	0,0001 %	0,001 %	0,01 %	0,1 %	0,1 %	0,2 %	0,5 %	1,0 %	geimpft	steril
Morelli	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+	—	—	+(+)	
Salkowski . . .	++	++	++	—	++	++	++	—	+	(+)	—	—	++	—
Ehrlich* . . .	++	++	++	—	++	++	++	—	++	+	—	—	+++	—
Baudisch . . .	+	++	++	+++	+	++	+++	+++	+	—	—	—	+	—

Nach 2 Tagen.

Reaktion	Nitrat				Nitrit				Dextrose				Ohne Zusatz	
	0,0001 %	0,001 %	0,01 %	0,1 %	0,0001 %	0,001 %	0,01 %	0,1 %	0,1 %	0,2 %	0,5 %	1,0 %	geimpft	steril
Morelli	++	++	++	++	++	++	++	++	+(+)	+	—	—	++	
Salkowski . . .	++	++	++	—	++	++	++	—	++	+(+)	—	—	++	
Ehrlich	+++	+++	+++	—					+++	+	—	—		
Baudisch . . .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	—	—	+++	

* Die Ausführung dieser Reaktion in den beiden letzten Versuchen wurde uns durch die entgegenkommende Ueberlassung des Dimethylamidobenzaldehyds durch die *Gesellschaft für chemische Industrie* in Basel ermöglicht, wofür wir dieser Firma an dieser Stelle unseren Dank abstatten.

Tabelle 10 (Fortsetzung).

Nach 5 Tagen.

Reaktion	Nitrat				Nitrit				Dextrose				Ohne Zusatz	
	0,0001 %	0,001 %	0,01 %	0,1 %	0,0001 %	0,001 %	0,01 %	0,1 %	0,1 %	0,2 %	0,5 %	1,0 %	geimpft	steril
Morelli	++(+)	++(+)	++(+)	++(+)	++(+)	++(+)	++(+)	++(+)	++(+)	++(+)	—	—	++(+)	
Salkowski . . .	++	++	++	—	++	++	++	—	++	++	—	—	++	
Ehrlich	+++	+++	+++	—	+++	+++	+++	—	+++	+++	—	—	+++	—
Baudisch . . .	+++	+++	+++	+++	+++	++(+)	+++	++	++(+)	+++	—	—	++	

Nach 10 Tagen.

Reaktion	Nitrat				Nitrit				Dextrose				Ohne Zusatz	
	0,0001 %	0,001 %	0,01 %	0,1 %	0,0001 %	0,001 %	0,01 %	0,1 %	0,1 %	0,2 %	0,5 %	1,0 %	geimpft	steril
Morelli	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	—	+++	
Salkowski . . .	++	++	++	—	++	++	++	—	++	++	—	—	++	
Ehrlich	+++	+++	+++	—	+++	+++	+++	—	+++	+++	—	—	+++	—
Baudisch . . .	+++	+++	+++	+++	++(+)	+++	+++	+++	+++	++(+)	—	—	+++	

Zeichenerklärung für Tabellen 10 und 11:

Morellt: + = schwach rosa
++ = rosa
+++ = ziegelrot

Salkowski: + = rosa
++ = rot

Ehrlich und *Baudisch:* + = rosa
++ = granatrot
+++ = kirschrot

Tabelle 11.

Nach 1 Tag.

Reaktion	Lactose							Ohne Zusatz	
	0,1 %	0,2 %	0,5 %	1 %	2 %	5 %	10 %	geimpft	steril
Morelli . .	(+)	—	—	—	—	—	—	++	
Salkowski .	(+)?	—	—	—	—	—	—	++	
Ehrlich . .	+	(+)	—	—	—	—	—	+++	
Baudisch . .	—	—	—	—	—	—	—	++(+)	

Nach 2 Tagen.

Reaktion	Lactose							Ohne Zusatz	
	0,1 %	0,2 %	0,5 %	1 %	2 %	5 %	10 %	geimpft	steril
Morelli . .	(+)	—	—	—	—	—	—	+++	
Salkowski .	(+)	—	—	—	—	—	—	++	
Ehrlich . .	+	(+)	—	—	—	—	—	+++	
Baudisch . .	—	—	—	—	—	—	—	++(+)	

Nach 5 Tagen.

Reaktion	Lactose							Ohne Zusatz	
	0,1 %	0,2 %	0,5 %	1 %	2 %	5 %	10 %	geimpft	steril
Morelli . .	++	+	(+)	—	—	—	—	+++	—
Salkowski .	++	—	—	—	—	—	—	++	—
Ehrlich . .	+++	(+)	(+)	—	—	—	—	++(+)	—
Baudisch . .	+++	—	—	—	—	—	—	++(+)	—

Nach 13 Tagen.

Reaktion	Lactose							Ohne Zusatz	
	0,1 %	0,2 %	0,5 %	1 %	2 %	5 %	10 %	geimpft	steril
Morelli . .	++++	+++	++	++	+	—	—	++++	—
Salkowski .	++	++	(+)?	—	—	—	—	++	—
Ehrlich . .	++(+)	+++	+	(+)	—	—	—	++(+)	—
Baudisch . .	++(+)	++(+)	—	—	—	—	—	+++	—

Dazu wurde je 1 cm³ wässeriger Dextrose-, Nitrit- oder Nitratlösung (resp. destillierten Wassers für die Kontrolle) gefügt, so dass sich der in der Tabelle wiedergegebene verschiedene Gehalt an diesen Substanzen ergab. Hierauf wurden die Röhrchen fraktioniert sterilisiert und mit je 3 mittleren Oesen einer 24stündigen Peptonwasserkultur von Stamm «I A» *(Bact. coli)* geimpft. Während der Versuchsdauer standen sie bei 37° C.

Die Reaktion nach *Salkowski-Kitasato* wurde wie folgt ausgeführt: 10 cm³ Kultur + 0,5 cm³ Natriumnitritlösung (0,02%ig) + 1,5 cm³ Schwefelsäure (10%ig). Nach eingetretener Reaktion Zusatz von 1 cm³ Amylalkohol.

Bei der *Baudisch*-Reaktion verwendeten wir 1 cm³ Kulturflüssigkeit und 0,5 cm³ Kalilauge-Nitromethangemisch.

7. Versuch.

Hier handelte es sich darum, den Einfluss verschiedener Zusätze von Milchzucker zum Peptonwasser bezüglich der Indolreaktionen festzustellen. Es wurde folgendes Peptonwasser benutzt:

Brunnenwasser	1000,0
Pepton «*Bern*»	10,0
Kochsalz	5,0
Kaliumnitrat	0,1
Soda krist.	0,2

Bei den 0,1—1% Milchzucker enthaltenden Röhrchen fügten wir zu je 9 cm³ Peptonwasser 1 cm³ entsprechender Zuckerlösung, bei den 2—10%-igen setzten wir den Zucker in Substanz zu und ergänzten je mit destilliertem Wasser auf 10 cm³. Abgesehen vom zugefügten Nitrat war in dem Peptonwasser kein solches vorhanden, sämtliche dazu verwendeten Substanzen waren auch nitritfrei; das Pepton enthielt keinen Trauben- oder Milchzucker. Dieses Peptonpräparat hatte sich in einem Kulturversuch (1%) mit den im 2. Versuch verwendeten Colistämmen für den Indolnachweis als brauchbar erwiesen, indem *Morelli* und *Ehrlich-Böhme* in entsprechender Weise positiv oder negativ ausfielen; die indolbildenden Stämme zeigten schon nach 24 Stunden deutlich positiven Ausfall bei beiden Reaktionen.

Bei der Probe nach *Ehrlich-Böhme* verwendeten wir als Extraktionsflüssigkeit je 2 cm³ Chloroform; die *Baudisch*-Reaktion wurde mit 2 cm³ Kulturflüssigkeit, 1 cm³ Kalilauge-Nitromethangemisch und ½ cm³ Amylalkohol, diejenige nach *Salkowski-Kitasato* wie im vorigen Versuche ausgeführt.

Zusammenfassung der Ergebnisse von Versuch 6 und 7.

1. Ein Zusatz von 0,0001 bis 0,1% Nitrat oder Nitrit zu 1%igem Bylapeptonwasser konnte das Zustandekommen einer Indolbildung schon nach 24-stündigem Aufenthalt der Kulturen bei 37° C. nicht verhindern. Der Nachweis desselben gelang nach *Morelli, Baudisch, Salkowski-K.* und *Ehrlich-B.*, doch versagten letztere beiden Reak-

tionen bei einem Gehalt von 0,1 %. Eine wesentliche Veränderung dieses Ergebnisses trat im Verlauf der weiteren Bebrütung während 10 Tagen abgesehen von einer Intensitätszunahme der Reaktionen nicht ein, d. h. die beiden Versager der *Salkowski-Kitasato-* und *Ehrlich-Böhme*-Probe blieben während dieser Zeit bestehen.

2. Die Gegenwart von 0,5 % Dextrose hatte bei diesem Nährmedium einen negativen Ausfall sämtlicher Reaktionen zur Folge. Bei 0,1 % konnte Indol schon nach 24-stündigem Aufenthalt der Kulturen bei 37° mit allen 4 Proben festgestellt werden, bei 0,2 % versagte einzig die *Baudisch*-Reaktion nach dieser Zeit gänzlich, die jedoch nach 48 Stunden dann auch positiv wurde. Auch hier erfolgte im Verlauf von 10 Tagen eine Zunahme im Intensitätsgrade der vier Reaktionen.
3. Die Anwesenheit von Lactose hat sich anfänglich auffallenderweise noch stärker störend bemerkbar gemacht als diejenige des Traubenzuckers, indem nach 1 und 2 Tagen einzig die *Ehrlich-Böhme*-Reaktion bei 0,1 % Zuckergehalt ein deutlich positives Resultat zeitigte. Diese Differenz ist vielleicht durch den Umstand zu erklären, dass hier (aus äusseren Gründen) ein anderes Pepton (Pepton «*Bern*») zur Verwendung gekommen ist. Im Verlaufe von 5 Tagen hatte dann bei diesem Lactosegehalt, wie der Ausfall aller 4 Reaktionen ergab, eine kräftige Indolbildung eingesetzt und nach 13 Tagen lieferte die *Ehrlich-Böhme*-Probe auch bei 0,5 %, die *Morelli*-Probe sogar bei 2 % Lactosegehalt ein deutlich positives Ergebnis.
4. Aus dem negativen Ausfall einer einzigen Probe bei Gegenwart von Nitraten, Nitriten, Trauben- und Milchzucker darf also nicht ohne weiteres der Schluss auf das Fehlen von Indol gezogen werden. Bemerkenswert ist besonders das Versagen der als am zuverlässigsten geltenden *Ehrlich-Böhme*-Reaktion bei 0,1 % Nitrat oder Nitrit.
5. Die *Morelli*-Probe lieferte bei den Nitrat-, Nitrit- und Dextrosezusätzen ebenso brauchbare Resultate wie die übrigen; bei Gegenwart von Lactose erwies sich ihr die *Ehrlich-Böhme*-Methode anfänglich ein wenig überlegen, nach 5 Tagen erzielten die beiden Methoden gleich gute Ergebnisse und nach 13 Tagen zeigte sich die *Morelli*'sche Reaktion am empfindlichsten. Eine wesentliche Ueberlegenheit dieser Probe gegenüber den anderen konnte also andererseits auch nicht festgestellt werden.

Wir gelangen also in bezug auf die Beurteilung der Brauchbarkeit des Verfahrens nach *Morelli* auf Grund der mitgeteilten Versuchsergebnisse zu folgenden Schlusssätzen:

1. Für die Beobachtung der *Morelli*-Reaktion empfiehlt es sich, die ins Kulturröhrchen eingehängten Oxalsäurepapierstreifen im durchfallenden Licht zu betrachten und dabei mit einem die Reaktion nicht aufweisenden Kon-

trollstreifen zu vergleichen. Der Beginn ihres positiven Ausfalles dokumentiert sich dann in einer schmutzigen Verfärbung des Papierstreifens, die bald in ein deutliches Rosarot übergeht.

2. Was ihre Empfindlichkeit gegenüber Indol, wenn es in Peptonwasser gelöst ist, anbetrifft, so nimmt sie nach 24-stündiger Einwirkung dieses Körpers unter den 4 verglichenen Methoden — es kamen noch diejenigen von *Salkowski-Kitasato, Ehrlich-Böhme* und *Baudisch* zur Ausführung — eine Mittelstellung ein, übertrifft diese aber bei einer erst nach einigen Tagen stattfindenden Beobachtung.

3. Um dieses Verfahren auch bezüglich der Raschheit des Indolnachweises in flüssigen Kulturen zu einem mit den Vergleichsreaktionen in gleiche Linie zu stellenden zu gestalten, hat sich eine Peptonkonzentration von 1% nicht immer als genügend erwiesen, indem sich die Indolbildung mit *Witte*pepton unter diesen Umständen mittelst der Methode von *Salkowski-Kitasato* einen Tag früher feststellen liess. Andererseits zeigte sich diese Konzentration bei Verwendung von *Byla*pepton als vollständig zweckentsprechend. Wurde das *Witte*pepton jedoch in 5%iger Konzentration verwendet, so liess sich die Indolbildung auch beim Verfahren nach *Morelli* bereits nach 24 Stunden in einwandfreier Weise feststellen.

4. Eine Anzahl von dieser Methode eigentümlichen Eigenschaften charakterisieren dieselbe als ein besonders empfehlenswertes Indolnachweisverfahren, nämlich:

a) Ihre äusserst einfache Technik.

b) Die Möglichkeit der Verwendung bei flüssigen und festen Nährmedien ohne Zerstörung der Kultur, womit auch eventuelle, bei Anstellung der anderen Reaktionen vorhandene Infektionsmöglichkeiten ausgeschlossen sind.

c) Der Umstand, dass das Reagens der Einwirkung der Kultur von Anfang an ausgesetzt werden kann, so dass infolge der Beständigkeit der einmal eingetretenen und immer intensiver werdenden Rotfärbung ein Versagen des Indolnachweises wegen bereits eingetretener Verdampfung dieses Körpers bei alten Kulturen vermieden wird.

5. In den Peptonlösungen eventuell vorkommende verunreinigende Substanzen wie Nitrate, Nitrite und Traubenzucker üben einen die Indolbildung oder den Indolnachweis störenden Einfluss aus. Ein Gehalt von 0,1% der genannten Salze beeinträchtigte die *Morelli*-Reaktion in keiner Weise, hingegen war das beim Traubenzucker (bei einer 2tägigen Kultur) der Fall, der in 0,5%iger Konzentration ein vollständig negatives Resultat bedingte. Eine ähnliche Wirkung war beim Milchzucker zu beobachten.

Für den einwandfreien Nachweis des Indolbildungsvermögens eines Mikroorganismus ist es daher bei dem Verfahren nach *Morelli* wie bei den anderen Indolreaktionen notwendig, mit völlig zuckerfreien Nährmedien zu arbeiten. Dies wird erreicht entweder durch Verwendung einer Tryptophannährlösung an Stelle des Peptonwassers oder — in Anbetracht der schwie-

rigen Beschaffbarkeit dieses Körpers — durch die Prüfung des zu verwendenden Peptonwassers auf Zuckerabwesenheit. Es kann dies in einfacher Weise geschehen mittelst Impfung des in einem *Smith*'schen Gärkölbchen befindlichen Peptonwassers mit *Bact. coli.*

Literatur.

Baudisch, O., Ueber eine neue Indolreaktion. Zeitschr. f. physiolog. Chemie. Bd. 94.

Bleisch, M., Ueber einige Fehlerquellen bei Anstellung der Cholerarotreaktion und ihre Vermeidung. Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 14.

Böhme, A., Die Anwendung der Ehrlichschen Indolreaktion für bakteriologische Zwecke. Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. Bd. 40.

Buard, G., Recherche de l'indol dans les cultures microbiennes. Compt. rend. Soc. Biol. T. 65. 1908.

Conradi, H. und *Bierast,* W., Bact. coli commune. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von *Kolle*, W. und *Wassermann*, A. II. Aufl.

Denigès, G., Nouveaux réactifs de l'indol;

— Réactions différentielles de l'indol et du scatol. Compt. rend. Soc. Biol. 1908.

Fischer, E., Ber. d. dtsch. chem. Gesellsch. Bd. XIX, p. 2988. Zit. nach *Böhme.*

Gorini, Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. Bd. 13. Zit. nach *Zipfel.*

de Graaff, W. C., Untersuchungen über Indolbildung des Bacterium coli commune. Centralbl. f. Bact. I. Abt. Orig. Bd. 49.

Herzfeld, E. und *Klinger,* R., Quantitative Untersuchungen über den Indol- und Tryptophanumsatz der Bakterien. Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. Bd. 76.

Kitasato, S., Die negative Indol-Reaktion der Typhusbazillen im Gegensatz zu anderen ähnlichen Bazillenarten. Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 7.

Konrich, Zur Bewertung des Bacterium coli im Wasser. Klinisches Jahrbuch, Bd. 23.

Lehmann, K. B. und *Neumann*, R. O., Atlas und Grundriss der Bakteriologie. 5. Auflage.

Lösener, W., Ueber das Vorkommen von Bakterien mit den Eigenschaften der Typhusbazillen in unserer Umgebung ohne nachweisbare Beziehungen zu Typhuserkrankungen nebst Beiträgen zur bakteriologischen Diagnose des Typhusbazillus. Arb. aus d. Kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. 11.

Mazzetti, L., Beitrag zum Studium des Stoffwechsels der Choleravibrionen. Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. Bd. 68.

Morelli, G., Ueber ein neues Verfahren zum Nachweis von Indol auf Nährsubstraten. Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. Bd. 50.

Pöhl, Ueber einige biologisch-chemische Eigenschaften der Mikroorganismen im allgemeinen und über die Bildung der Ptomaïne durch die Cholerabazillen im speziellen. Ber. d. dtsch. chem. Gesellsch. 1886, I., 1159. Zit. nach *Lösener.*

Rocek, J., Ueber die Wirkung des Indols auf Typhusbazillenkulturen als Grundlage für therapeutische Versuche. Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. Bd. 77.

Selter, Ueber Indolbildung durch Bakterien. Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. Bd. 51.

Zinno, Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. Bd. 15. Zit. nach *Zipfel.*

Zipfel, H., Zur Kenntnis der Indolreaktion. Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. Bd. 64.

— Weitere Beiträge zur Kenntnis der Indolreaktion. Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. Bd. 67.