

reich der unvermeidlichen Versuchsfehler liegen. Gestattet es aber die Natur der Verbindung mit Zinnchlorür die Quantität des hinzutretenden Wasserstoffs zu ermitteln, so kann dieses, wie vorstehende Analyse zeigt, mit der grössten Genauigkeit geschehen.

Greifswald, den 8. Januar 1878.

9. Alb. Fitz: Ueber Schizomyceten-Gährungen III.

Mit einer Tafel.

(Mittheilung aus dem chem. Institut d. Universität Strassburg.)

(Eingegangen am 26. December; verlesen in der Sitzung von Hrn. A. Pinner.)

Nachträge zur Mittheilung II¹⁾.

1) Normalbutylalkohol. J. Pierre und E. Puchot²⁾ fanden, dass der bei 108⁰ C. siedende Isobutylalkohol, mit Wasser gemengt, constant bei 90.5⁰ C. siedet; die Volumina Wasser zu Isobutylalkohol im Destillat verhalten sich wie 1:5. Bei dem normalen Butylalkohol war Aehnliches zu erwarten; in der That ergab der Versuch, dass der bei 117⁰ siedende normale Butylalkohol, mit Wasser gemengt, constant bei 93⁰ C. siedet. Um das Verhältniss von Wasser zu Normalbutylalkohol im Destillat zu bestimmen, wurde ein gemessenes Volumen Destillat zur vollständigen Abscheidung des Butylalkohols mit Potasche bis zur Sättigung versetzt und das Volumen des Butylalkohols gemessen; es ergaben sich die Volumina Wasser zu Normalbutylalkohol annähernd wie 1 zu 2.

2) Flüchtige Säure der Glyceringährung. Um zu sehen, ob bei der Glyceringährung auch Essigsäure auftritt, wurde eine grössere Menge flüchtiger Säure darauf untersucht. 130 Gr. wasserfreies Kalksalz, gewonnen aus 900 Gr. Glycerin, wurden mit der berechneten Menge Salzsäure versetzt, die abgeschiedene ölförmige Säure abgehoben, die rückständige Chlorcalciumlösung, in welcher etwa vorhandene Essigsäure zu suchen war, mit einer angemessenen Menge Wasser versetzt und destillirt. Die abdestillirte Säure wurde in das Kalksalz übergeführt und fraktionirt mit Silberlösung gefällt. Die umkrystallisirten Silbersalze gaben folgende Zahlen:

1) 55.9 pCt. Ag.	4) 61.5 pCt. Ag.
2) 56.6 - -	5) 62.0 - -
3) 57.3 - -	6) 63.8 - -

Buttersaures Silber verlangt 55.4, essigsäures 64.7.

Das Auftreten einer geringen Menge von Essigsäure ist somit nachgewiesen.

¹⁾ Diese Berichte X, 276.

²⁾ C. r. t. 78, p. 599.

3) Störungen der Glyceringährung. Der Butylalkohol liefernde Schizomycet der Glyceringährung zeigt grosse Neigung, in Dauersporen überzugehen, und zwar ist es nicht immer, wie bei dem in der Mittheilung II beschriebenen Versuch, die Anhäufung des Butylalkohols, die ihn dazu veranlasst, sondern manchmal eine andere, vorläufig unbekannte Ursache; in diesem Falle vermehrt er sich zwar in den ersten Tagen rapid, geht aber schon am 4ten oder 5ten Tage in Dauersporen über; gleichzeitig hört die Gährung auf.

In selteneren Fällen tritt gleich im Anfang ein Schizomycet auf, der die Schwefelsäure der zugesetzten Salze zu SH_2 reducirt¹⁾; eine Gährung kommt dann überhaupt nicht zu Stande. Zuweilen tritt dieser SH_2 -Schizomycet erst gegen das Ende der Gährung auf. Dem SH_2 -Geruch ist alsdann ein Mercaptan-Geruch beigemischt.

In einem einzigen Falle trat, nachdem in den ersten 8 Tagen die Gährung trefflich verlaufen war, Stillstand derselben und zugleich ein scheusslicher, unerträglicher Fäulnissgestank auf²⁾. Beim Abdestilliren des Butylalkohols ging der stinkende Körper mit über; durch Zusatz einiger Tropfen Schwefelsäure und Destillation konnte der Butylalkohol davon befreit werden.

All' diesen Störungen wird vorgebeugt durch Anwendung eines möglichst reinen Aussaatmaterials und nöthigenfalls durch Kochen der Flüssigkeit vor der Aussaat.

4) Flüchtige Säure der Mannitgährung. Einige Gr. Kalksalz wurden mit Silberlösung fraktionirt gefällt. Die Silberbestimmungen ergaben:

1) 54.7	4) 55.3
2) 54.9	5) 57.6
6) 55.2.	

Die Säure besteht somit aus Buttersäure mit einer kleinen Beimengung von Capronsäure und Essigsäure.

5) Nichtflüchtige Säure der Mannitgährung. Ausser Bernsteinsäure wurde aus 900 Gr. Mannit 7.8 Gr. krystallisirtes Zinksalz einer syrupförmigen Säure erhalten. Das Zinksalz gab:

H_2O	Zn-Gehalt des H_2O -freien Salzes
18,3 pCt.	26,8 pCt.

Milchsaures Zink verlangt 18.2 pCt. H_2O , das wasserfreie Salz 26.7 pCt. Zn.

Die syrupförmige Säure ist somit gewöhnliche Milchsäure; sie verdankt ihre Entstehung vermuthlich einer Nebengährung durch ein anderes Ferment.

¹⁾ Vgl. die interessanten Mittheilungen von Cohn über SH_2 erzeugende Beggiatoen; dessen Beiträge zur Biologie der Pflanzen, Bd. I, Heft 3, S. 173 ff., sowie die daselbst citirte Literatur.

²⁾ Als N-haltiger Nährstoff war schwefelsaures Ammoniak genommen worden.

6) Stärke. Das alkoholische Destillat reagirt sauer¹⁾; um zu sehen, wie viel flüchtige Säure übergegangen war, wurde dieselbe an Kalk gebunden und das Kalksalz bei 100^o getrocknet; dasselbe wog nur 0.3 Gr. (von 500 Gr. Stärke).

Nach dem Abdestilliren des Alkohols wurde die rückständige Flüssigkeit auf ein kleines Volumen eingedampft, mit der nach der Menge des verschwundenen kohlensauren Kalkes berechneten Menge ClH versetzt und die flüchtige Säure mit überhitztem Wasserdampf abdestillirt. Das Destillat wurde in Portionen von je 1 Liter aufgefangen, die Säure in das Kalksalz übergeführt und dieses bei 100^o getrocknet. Der erste Liter Destillat gab 192 Gr. Kalksalz, der sechste Liter 0.7 Gr. Zusammen wurden erhalten 270.2 Gr. Kalksalz.

Einige Gr. des ersten Kalksalzes wurden fraktionirt mit Silberlösung gefällt.

1) 55.2 pCt. Ag.	5) 55.4 pCt. Ag.
3) 55.3 - -	7) 55.5 - -

Die Säure des ersten Destillates besteht somit aus reiner Buttersäure.

Aus einer Portion Kalksalz des zweiten Destillates wurden 10 Silbersalze dargestellt, von denen 3 analysirt wurden.

1) 55.7 pCt. Ag.
6) 61.6 - -
10) 63.5 - -

Die Säure des zweiten Liters Destillat besteht somit aus einem Gemenge von Buttersäure und Essigsäure.

Von 8 Silbersalzen des dritten Liters gaben:

1) 64.3
5) 64.3
8) 64.2.

Die Säure besteht somit aus Essigsäure.

Aus den Zahlen geht hervor, dass beim Destilliren eines wässrigen Gemenges von Essigsäure und Buttersäure zuerst Buttersäure, zuletzt Essigsäure übergeht²⁾.

100 luftrockne Stärke lieferten etwa 35 Buttersäure und 9 Essigsäure. Die Stärkegährung ist somit eine empfehlenswerthe Methode zur Darstellung von Buttersäure.

Nach dem Abdestilliren der flüchtigen Säure wurde die rückständige Flüssigkeit abgedampft, filtrirt und wiederholt mit Aether ausgeschüttelt. Nach dem Abdestilliren des Aethers hinterblieb Bernsteinsäure; sie schmolz bei 182^o C. und gab mit Eisenchlorid die bekannte Reaction. Aus 500 Gr. Stärke wurde erhalten 0.71 Gr.

1) Ebenso das alkoholische Destillat von der Mannit- und Dextringährung; das der Glycerinährung dagegen reagirte stets alkalisch.

2) Vgl. auch Butlerow, d. Ber. IV, S. 392 und Schorlemmer, Ann. Chem. Ph. 188, S. 252 und 253.

Bernsteinsäure. Ausser Bernsteinsäure wurde eine unbedeutende Menge syrpförmiger Säure erhalten; es konnte keine, zur Analyse hinreichende Menge krystallisiertes Zinksalz daraus gewonnen werden.

7) Inulin. Inulin vergäht ebenso leicht wie Stärke; ich begnügte mich, die Bildung von Alkohol und flüchtiger Säure zu constatiren; eine genauere Untersuchung der Gährungsprodukte bot vorläufig kein Interesse; die Produkte sind wohl die nämlichen wie bei der Stärke; dasselbe ist wohl auch der Fall bei Rohzucker, Dextrose und Levulose.

8) Milchzucker. Von den gährungserregenden Pilzen der Gattungen *Saccharomyces* und *Mucor* wird Milchzucker nicht invertirt und nicht in Gährung versetzt¹⁾. Die älteren entgegenstehenden Angaben sind unrichtig; man hatte bei den früheren Versuchen unreine, schizomycetenhaltige Hefe angewandt²⁾.

Von Schizomyceten wird Milchzucker leicht in Gährung versetzt. 500 Gr. Milchzucker lieferten 14.2 Gr. entwässerten Roh-Alkohol, bestehend wesentlich aus Aethylalkohol mit einer kleinen Beimengung eines höheren Alkohols. Die übrigen Gährungsprodukte wurden nicht untersucht.

9) Dulcit. Als Gährungsprodukte wurden erhalten: ein wenig Alkohol, viel flüchtige Säure (11 Gr. Kalksalz von 20 Gr. Dulcit) und eine Spur einer nicht flüchtigen Säure, wahrscheinlich Bernsteinsäure. Die flüchtige Säure wurde fraktionirt aufgefangen; die erste Fraktion gab ein Silbersalz mit 54.8 pCt. Ag, die letzte mit 57.1 pCt. Ag. Die flüchtige Säure besteht somit aus Buttersäure mit einer Spur einer höheren, und einer kleinen Beimengung einer niedrigeren Säure.

10) Quercit. Die Untersuchung der vergohrenen Flüssigkeit von 20 Gr. Quercit ergab: keinen Alkohol, 7.6 Gr. Kalksalz der flüchtigen Säure, keine nichtflüchtige Säure. Die erste Fraktion der flüchtigen Säure gab ein Silbersalz mit 55.2 pCt. Ag, die letzte 55.6. Die kalt gesättigte Lösung des Kalksalzes, in heisses Wasser von 70° C. getaucht, erstarrte sofort vollständig, so dass beim Umdrehen des Reagenrohres nichts ausfloss. Quercit lieferte demnach als einziges Gährungsprodukt Normalbuttersäure. Das Ferment war verschieden von den Glycerinfermenten, und wahrscheinlich identisch mit einem Ferment, das ich an einer späteren Stelle dieser Mittheilung als neues Buttersäureferment beschreibe.

11) Erythrit. 20 Gr. Erythrit lieferten 1.2 Gr. Alkohol, 2.6 Gr. Kalksalz der flüchtigen Säure und eine Spur einer nichtflüchtigen Säure. Die Gährung wurde gestört durch den SH₂-Schizomycet. Der Al-

¹⁾ Vgl. Pasteur, *Etudes sur la bière* S. 257 u. 258 und Fitz, d. Ber. IX, S. 1352.

²⁾ Nach Nägeli scheiden die Schizomyceten ein ungeformtes Ferment aus, das Milchzucker invertirt und Stärke in Dextrose überführt; vgl. dessen „*niedere Pilze*“ 1877, S. 12.

kohol roch deutlich nach Mercaptan; beim Abdestilliren der flüchtigen Säure zeigte das ganz im Anfang Uebergende den stechenden Geruch der schwefligen Säure, der bei schwachem Erwärmen noch stärker hervortrat; am Boden setzte sich ein wenig Schwefel ab, wahrscheinlich entstanden durch Wechselersetzung von SH_2 und SO_2 . Als N-haltiger Nährstoff war schwefelsaures Ammoniak genommen worden.

12) Glycolsaurer Kalk. Sehr oft wiederholte Versuche mit dem verschiedensten Aussaatmaterial, glycolsauren Kalk in Gährung zu versetzen, gaben stets ein negatives Resultat.

13) Gemenge flüchtiger Fettsäuren. Bei der Untersuchung der flüchtigen Säure der Stärkegährung ergab sich, dass beim Destilliren eines wässerigen Gemenges von Essigsäure und Buttersäure zuerst Buttersäure, zuletzt Essigsäure übergeht. Ferner geht aus den in Mittheilung II¹⁾ angegebenen Silberbestimmungen mit grosser Wahrscheinlichkeit hervor, dass beim Destilliren eines wässerigen Gemenges von Buttersäure und Capronsäure zuerst Capronsäure, zuletzt Buttersäure übergeht.

Um dies ganz sicher festzustellen, wurde folgender Versuch ausgeführt: Es wurden 3 Gr. Essigsäure, 4 Gr. Buttersäure und 3 Gr. Capronsäure mit 500 Cc. Wasser vermischt und destillirt, wobei das Wasser im Kolben von Zeit zu Zeit ersetzt wurde. Das Destillat wurde fraktionirt aufgefangen; die Grösse einer Fraktion wurde so gewählt, dass sie ca. 1 Gr. Kalksalz lieferte. Die erste Fraktion gab ein Silbersalz mit 48.7 pCt. Ag, eine mittlere Fraktion 55.4, die letzte Fraktion 64.3. Capronsäures Silber verlangt 48.4, buttersäures 55.4, essigsäures 64.7 pCt. Ag. Es ergibt sich hieraus, dass beim Destilliren eines wässerigen Gemenges von Essigsäure, Buttersäure und Capronsäure, zuerst Capronsäure, sodann Buttersäure und zuletzt Essigsäure übergeht, — ein Verhalten, das bei der Untersuchung eines Gemenges flüchtiger Säuren mit Vortheil benutzt werden kann.

Ferment-Organismen.

Die niederen Pilze lassen sich in drei Gruppen eintheilen²⁾: 1) Die Schimmelpilze, 2) die Sprosspilze, 3) die Schizomyceten oder Spaltpilze.

Wir haben es hier nur mit den letzteren zu thun. Die Schizomyceten oder Spaltpilze sind dadurch charakterisirt, dass sie sich durch Spaltung vermehren. Die Zelle streckt sich und bildet in der Mitte eine Querwand; die zwei neuen Zellen vermehren sich in derselben Weise weiter.

Die meisten Spaltpilze können nur bei Anwesenheit von Sauerstoff leben und sich vermehren; sie verbrennen die Kohlenstoffver-

¹⁾ Diese Berichte X, S. 279.

²⁾ Vergl. Nägeli, die niederen Pilze. 1877.

bindungen der Nährflüssigkeit (abgesehen von einem kleinen Theil, den sie assimiliren) zu Wasser und Kohlensäure. Pasteur nennt sie Aerobier.

Physiologisch verschieden hiervon sind diejenigen Spaltpilze, die Gährungsreger sind. Dieselben besitzen (ebenso wie diejenigen Sprosspilze, die Gährung zu erregen vermögen) die von Pasteur entdeckte merkwürdige Eigenschaft, dass sie bei völliger Abwesenheit von Sauerstoff leben und sich vermehren können (Anärobier); und es ist gerade der Abschluss von Sauerstoff, der sie zu Gährungsregern macht. Bei Anwesenheit von Sauerstoff sind sie Aerobier, verbrennen sie die Kohlenstoffverbindungen; bei Abwesenheit von Sauerstoff als Anärobier zersetzen sie die gährungsfähige Substanz, indem sie die kinetische Energie, die sie verbrauchen, um verschiedene Arbeit zu leisten, derjenigen Energie entnehmen, die frei wird bei dem Zerfall der gährungsfähigen Substanz in die Gährungsprodukte¹.

Es gehören hierher die Ferment-Organismen, die milchsauren Kalk, Glycerin, weinsauren Kalk u. s. w. in Gährung versetzen.

Die Ferment-Organismen der Glyceringährung gehören zu einer Gattung, die von Pasteur mit *vibrio* bezeichnet wird; Cohn²) nennt diese Gattung Bacillus.

Es sind cylinderförmige Zellen, die sich durch Streckung und Quertheilung vermehren. Diese Zellen können in Dauersporen übergehen. Es bildet sich an einem Ende der Zelle eine lichtglänzende Stelle, die sich mit einer immer deutlicher werdenden Membran umgiebt; der Rest der Mutterzelle wird mehr und mehr blass und verschwindet schliesslich ganz; es bleiben nur die kurz cylindrischen Dauersporen mit breiten, dunklen Contouren und lichtglänzendem Inhalt. Die Dauersporen sind eingehüllt von einer kugelförmigen Masse, die nur bei sehr günstiger Beleuchtung und Einstellung zu sehen ist. Unter günstigen Bedingungen keimen sie wieder zur Vegetationsform aus.

Nach Koch³) geht die Keimung folgendermassen vor sich: Die einhüllende, kugelförmige Masse verlängert sich in der Richtung der Längsaxe der Spore nach einer Seite, wird langgezogen eiförmig und umgiebt sich mit einer Membran; gleichzeitig verliert die Spore ihren Glanz; ihre alten Contouren werden immer blässer und verschwinden schliesslich. Der Keimling selbst vermehrt sich in gewöhnlicher Weise durch Spaltung.

Das Temperatur-Optimum der Bacillen scheint 37—40° zu sein.

1) Vergl. Pasteur, Etudes sur la bière, Cap. VI, sowie C. r. t. 52, S. 1260 bis 64 und t. 75, S. 788.

2) F. Cohn, Beiträge zur Biologie der Pflanzen, Bd. I, Heft 2 und 3. Bd. II, Heft 2.

3) Cohn's Beiträge zur Biologie der Pflanzen, Bd. II, Heft 2, S. 289.

Die Vegetationsform wird bei 100° C., wahrscheinlich sogar schon weit unter 100° C. getödtet. Die an der Luft getrockneten Dauersporen dagegen, mit Wasser übergossen und gekocht, verlieren ihre Keimfähigkeit durch 5 Minuten lang und länger andauerndes Kochen nicht ¹⁾).

Der Bacillus, der bei meinen ersten Gährversuchen mit Glycerin bei fortgesetzter Cultur fast reinen normalen Butylalkohol (mit einer minimalen Beimengung von Aethylalkohol) bildete, ist von stattlichen Dimensionen; er ist durchschnittlich 2 Mikromillimeter breit und 5—6 lang. Die Zellen bewegen sich in lebhaftester Weise ²⁾), indem sie dabei, wie es scheint, um ihre Längsaxe rotiren.

Der Bacillus fiel mir ganz zufällig in die Hände; bei weiteren Versuchen war ich stets angewiesen auf den mit Dauersporen beladenen kohlensauren Kalk, den ich von den ersten Versuchen her aufbewahrte. Bei einer folgenden Versuchsreihe wurde als erstes Aussaatmaterial frische Kuh-Excremente ³⁾ genommen.

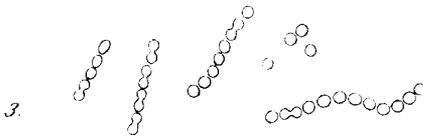
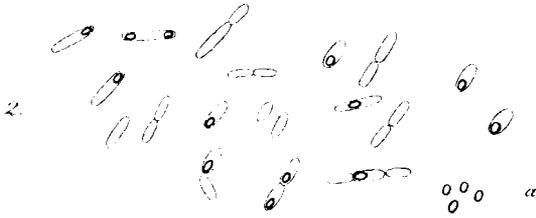
Bei Aussaat von ein wenig Kuh-Excrementen in eine Glycerin-gährflüssigkeit trat alsbald Gährung ein. Um die Natur des dabei sich bildenden Alkohols festzustellen, wurde eine grössere Menge Glycerin zur Vergährung gebracht, wobei als Aussaat ein Tropfen der gährenden Flüssigkeit des Vorversuchs verwandt wurde. Der Alkohol bestand aus gleichen Theilen Aethylalkohol und Normalbutylalkohol, das Ferment bestand aus einem Gemenge zweier Bacillen, einem breiteren und einem schmälere. Es war jetzt im Hinblick auf die erste Versuchsreihe wahrscheinlich, dass der breitere Bacillus normalen Butylalkohol, der schmälere Aethylalkohol aus Glycerin bildet.

Es war nun die Aufgabe zu lösen, diese beiden Bacillen, jeden für sich, rein zu cultiviren, zu sehen, was jeder aus dem Glycerin macht, und ihre Identität oder Verschiedenheit von den von Pasteur und von Cohn beschriebenen Formen festzustellen. Cohn beschreibt einen Bacillus, der leicht rein zu cultiviren ist. Meine Versuche ergaben, dass derselbe Glycerin in Gährung versetzt, und dass der dabei gebildete Alkohol reiner Aethylalkohol ist: dieser Bacillus ist nur etwa halb so breit als jener der normalen Butylalkohol bildet; man könnte sie als Aethyl- und Butyl-Bacillus unterscheiden. Nach vielen fruchtlosen Versuchen gelang es endlich auch, eine Methode zu finden, um den breiten Bacillus, unabhängig von dem Material meiner ersten Versuche, jederzeit leicht zu erhalten. Es war noch das Verhältniss des schmalen und des breiten Bacillus zu Pasteur's Buttersäure-

¹⁾ Es gilt dies wahrscheinlich nicht für alle Bacillen.

²⁾ In der Periode vor dem Beginn der Gährung, wo sie bei Anwesenheit von O an der Oberfläche der Flüssigkeit wachsen, sind sie unbeweglich.

³⁾ Zu der Wahl von Kuh-Excrementen führte eine theoretische Ueberlegung, die hier anzugeben von keinem Interesse ist.



ferment festzustellen. Cohn spricht die Vermuthung aus, sein Bacillus möchte identisch sein mit dem Pasteur'schen Buttersäureferment. Oefter wiederholte Versuche zeigten mir jedoch, dass der Cohn'sche Bacillus subtilis, in eine Gährflüssigkeit von milchsaurem Kalk ausgesät, keine Gährung erregt. Ueber die Beziehung des breiten Bacillus zu dem Pasteur'schen Ferment sind die Versuche noch nicht abgeschlossen. Bei Gelegenheit der mit milchsaurem Kalk angestellten Versuche stiess ich auf einen, von dem Pasteur'schen Ferment gänzlich verschiedenen Spaltpilz, der milchsauren Kalk mit Energie vergährt.

Ich beschreibe im Folgenden die Einzelheiten der vorstehend kurz angedeuteten Versuche, sowie Versuche, die sich daran anschliessen.

Cohn¹⁾ erhält seinen Bacillus, indem er Heu mit Wasser 4 Stunden lang bei 36° C. digerirt, filtrirt und das Filtrat 5—15 Minuten lang zum Kochen erhitzt. Es werden dadurch alle von der Oberfläche des Heues herrührenden Pilzsporen getödtet, mit Ausnahme der Dauersporen des Bacillus, die eine Temperatur von 100° C. eine kurze Zeit zu ertragen vermögen. Nach dem Kochen wird das Gefäss, das die Heu-Infusion enthält, in einen Thermostat gesetzt. Nach 2 Tagen ist die Oberfläche der Flüssigkeit mit einer Haut bedeckt, bestehend aus Bacillen von durchaus einheitlicher Form.

Ich modificirte die Cohn'sche Methode etwas; für meinen Zweck war es ganz überflüssig, eine eigentliche Infusion zu machen, Stoffe aus dem Heu auszuziehen; wesentlich war nur, den Staub, der auf der Oberfläche des Heues haftet und in welchem sich Dauersporen von Bacillen befinden, abzuwaschen und das Waschwasser zur Herstellung einer Glyceringährflüssigkeit zu verwenden. Man bewegt eine Handvoll Heu mit $\frac{1}{4}$ Liter Wasser einige Minuten lang gehörig durcheinander, filtrirt durch ein Drahtnetz, setzt der Flüssigkeit angemessene Mengen von Glycerin, Salzen und kohlensaurem Kalk zu, bedeckt die Oeffnung des Kolbens mit einer Kappe von Filtrirpapier, kocht 5 Minuten lang und bringt den Kolben alsdann in einen Thermostat von 40° C. Am folgenden Tage ist die Oberfläche der Flüssigkeit mit einer Bacillenhaut bedeckt, nach 2 Tagen ist sie in voller Gährung. Zur Feststellung der Natur des Alkohols wurden zwei Gährflüssigkeiten mit je 100 Gr. Glycerin hergestellt, durch Kochen sterilisirt und nach dem Erkalten in jede Gährflasche ein Tropfen der gährenden Flüssigkeit des Vorversuchs ausgesät. Die Gährung verläuft ruhiger, gleichmässiger und ist länger andauernd²⁾ als die Gährung mit dem Butyl-Bacillus. Der erste Versuch gab 25.8, der zweite 25.7 Gr.

¹⁾ Dessen Beiträge zur Biologie der Pflanzen, Bd. II, Heft 2.

²⁾ 7 Wochen lang.

entwässerten Alkohol; derselbe siedete vollständig von 78—79° C., ist somit reiner Aethylalkohol.

Beim Abdestilliren der flüchtigen Säure ergab sich, dass merkwürdiger Weise nur eine unbedeutende Menge derselben vorhanden war; von 100 Gr. Glycerin wurde nur 1 Gr. Kalksalz der flüchtigen Säure erhalten; auch nichtflüchtige Säure war nur spurenweise vorhanden¹⁾.

Um den Butyl-Bacillus unabhängig von meinem ersten Material zu gewinnen, wurden folgende Versuche angestellt: Es wurde die Oberfläche verschiedener Pflanzen gewaschen, mit den Waschwässern Glycerin-gährflüssigkeiten hergestellt, 5 Minuten gekocht und die Kolben in den Thermostat gesetzt. Von Pflanzen wurden unter Anderem verwandt: Erbsen, Reis, Rüben, Schilfrohr, Zuckerrohr. In allen Fällen entwickelte sich nur der schmale Bacillus subtilis. Dies Resultat war auffallend. Es schien nun wahrscheinlich, dass die Dauersporen des Butyl-Bacillus sich zwar auf der Oberfläche dieser Pflanzen finden, dass sie aber der Temperatur von 100° C. nicht so gut Widerstand leisten, als die des Bacillus subtilis. Der Versuch bestätigte diese Vermuthung. Es wurde mit Heu-Waschwasser eine Glycerin-gährflüssigkeit hergestellt und diese, ohne vorher zu kochen, in den Thermostat von 40° C. gesetzt. Es trat stürmische Gährung ein und die mikroskopische Untersuchung zeigte den Butyl-Bacillus in prachtvoller Entwicklung fast rein; nur in seltenen Exemplaren war der schmale Bacillus beigemengt. Eine Wiederholung des Versuchs ergab dasselbe Resultat. Um eine noch reinere Cultur zu erhalten, säet man einen Tropfen in eine frische Glycerin-gährflüssigkeit und wiederholt dies einige Mal. Bei öfter wiederholten Versuchen zeigte sich übrigens, dass nicht jede Heusorte gleich gut geeignet ist; manchmal erhält man ein Gemenge der beiden Bacillen, in seltenen Fällen sogar den Bacillus subtilis vorherrschend. Der Inhalt der Zellen des Butyl-Bacillus wird durch Jod theilweise violett resp. schwarz gefärbt, und zwar entweder fast der ganze Inhalt, oder einzelne getrennte Partien desselben (2 bis 6), oder zuweilen auch nur eine einzelne kleine Stelle²⁾. Im Gegensatz hierzu wird der Inhalt des Bacillus subtilis durch Jod gelb gefärbt. Dies Verhalten kann zur Unterscheidung der beiden Bacillen benutzt werden; doch ist zu beachten, dass

1) Offenbar war das Glycerin nicht vollständig vergohren; durch Auffinden von noch günstigeren Versuchsbedingungen kann man wohl eine noch beträchtlich grössere Menge Aethylalkohol gewinnen.

2) Vergl. Van Tieghem, sur le Bacillus amylobacter. Bulletin de la société botanique de France 1877, t. 24. Sitzung vom 23. März, S. 128 ff. Der Bacillus amylobacter zeigt das nämliche Verhalten gegen Jod; er zerstört nach van Tieghem Cellulose.

Bei einem vorläufigen Versuch, bei welchem ich meinen Bacillus auf Filtrirpapier einwirken liess, wurde dasselbe nicht merklich angegriffen.

der Butyl-Bacillus dies Verhalten vielleicht nicht in allen Perioden seiner Entwicklung zeigt ¹⁾).

Wie schon früher erwähnt, stiess ich bei Gelegenheit von Versuchen mit milchsaurem Kalk auf ein neues Buttersäureferment; das Pasteur'sche Ferment gehört zu den Bacillen, das neue Ferment gehört nicht zu dieser Gattung; es ähnelt in der Form der Algen-gattung Nostoc. Es sind runde Zellen von 1.6—1.7 Mikromillimeter Durchmesser, rosenkranzförmig aneinander gereiht. Die länger gestreckten, in Theilung begriffenen Zellen mit Einschnürung in der Mitte sind 2—2.4 Mikromillimeter lang. Zur Gewinnung dieses Spaltpilzes geht man von Kuh-Excrementen als erstem Aussaatmaterial aus. Die Gährung des milchsauren Kalkes verläuft rasch und glatt. Es war von Interesse, die Gährungsprodukte zu untersuchen. Es wurde eine Gährflüssigkeit mit 100 Gr. milchsaurem Kalk hergestellt und ein Tropfen der gährenden Flüssigkeit des Vorversuchs ausgesät. Die Gährung war in wenigen Tagen beendet. Bei Untersuchung der Gährungsprodukte wurde erhalten 35.5 Gr. bei 100° C. getrocknetes Kalksalz der flüchtigen Säure (die Theorie verlangt 34.7 Gr.). Die Hauptmenge bestand ohne Zweifel aus normalbuttersaurem Kalk; ich beschränkte mich darauf, nach einer etwaigen Beimengung von Capronsäure und Essigsäure zu suchen. Die flüchtige Säure war in 8 Portionen von je $\frac{1}{4}$ Liter aufgefangen worden, wobei vor jeder erneuten Destillation $\frac{1}{4}$ Liter Wasser in den Destillirkolben gegeben wurde.

Etwa vorhandene Capronsäure war im ersten, etwa vorhandene Essigsäure im letzten Destillat zu suchen. Das erste partiell ausgefallte Silbersalz des ersten Destillates gab 52.0 pCt. Ag; das letzte Destillat gab ein Silbersalz mit 58.9 pCt. Ag. Eine kleine Bemengung von Capronsäure (Th. 48.4 pCt. Ag) und Essigsäure (Th. 64.7 pCt. Ag) ist somit nachgewiesen.

Als nichtflüchtige Säure wurde 0.04 Gr. Bernsteinsäure erhalten; sie schmolz bei 182° und gab die bekannte Reaction mit Eisenchlorid.

Es wurde später noch 3mal zu verschiedener Zeit der Versuch, das neue Ferment in der oben angegebenen Weise zu erhalten, wiederholt; es trat jedesmal in üppiger Entwicklung auf mit Gährung des milchsauren Kalks.

Der in dem ersten Theile dieser Mittheilung beschriebene Versuch mit Stärke ergab, dass die Stärkegährung eine vortreffliche Methode zur Darstellung von Buttersäure ist. Zur Zeit als jener Versuch angestellt wurde, war ich über die verschiedenen Ferment-Organismen noch nicht genauer orientirt. Um die Stärkegährung als Methode zur Darstellung von Buttersäure noch vollständiger auszubilden, musste

¹⁾ Die Untersuchung über den Butyl-Bacillus ist noch nicht abgeschlossen; es bleiben noch einige Punkte genauer zu erforschen.

der Versuch wiederholt werden mit möglichst rein cultivirten Spaltpilzen. In erster Linie wurde der so leicht rein zu erhaltende *Bacillus subtilis* genommen und eine minimale Spur davon in eine frisch ¹⁾ bereitete Stärkegährflüssigkeit ausgesät. Zur Bereitung der Gährflüssigkeit wurden 2 Liter Wasser auf 40° C. erwärmt, 100 Gr. Kartoffelstärke ²⁾, 0.1 Gr. phosphorsaures Kali, 0.02 Gr. schwefelsaure Magnesia, 1 Gr. Salmiak und 50 Gr. kohlensaurer Kalk zugefügt. Die Gährung verlief vortrefflich. 10 Tage nach der Aussaat war sie beendigt. Bei mikroskopischer Untersuchung mit Jod ergab sich, dass die Stärke völlig verschwunden war; es waren nur noch zweifelhafte Reste von Cellulose-Skeletten übrig. Als Gährungsprodukte wurden erhalten: 1.0 Gr. Alkohol, 34.7 Gr. Buttersäure, 5.1 Gr. Essigsäure und 0.33 Gr. Bernsteinsäure ³⁾.

Die flüchtige Säure wurde in 17 abwechselnd kleineren und grösseren Fractionen aufgefangen; die kleineren waren zu Analysen bestimmt. Es brauchten nicht alle kleinen Fractionen analysirt zu werden; es genügten 5 Silberbestimmungen, um die Natur der Säuren und ihre relativen Mengen festzustellen;

Fraction 1)	gab	55.3	pCt. Ag.
- 7)	-	55.6	- -
- 9)	-	55.8	- -
- 11)	-	56.3	- -
- 13)	-	62.6	- -

Zusammen wurden erhalten 48.9 Gr. Kalksalz, wovon 38.7 Gr. auf die 9 ersten Fractionen fallen; ich unterlasse es, die einzelnen Zahlen anzuführen. Die oben angegebene Zahl 34.7 Gr. Buttersäure ⁴⁾ halte ich für relativ sehr genau; sie wird nur wenig von dem wirklichen Werth abweichen. Die Zahl 5.1 für Essigsäure dagegen ist ein wenig zu hoch; es ging nämlich ganz zuletzt, bei stärkerem Einkochen und bei Durchleiten von überhitztem Wasserdampf ein wenig ClH mit über; ich schätze, dass die Zahl 4 dem wirklichen Werth nahe kommt. Da dieser Punkt ganz gleichgültig ist, habe ich mich nicht weiter dabei aufgehalten.

Bemerkenswerth bei den Silberbestimmungen ist der Sprung bei 11ten und 13ten Fraction von 56.3 pCt. Ag auf 62.6 Gr. Ag. Die

¹⁾ Es ist nicht gut, die Flüssigkeit vor der Aussaat lange herumstehen zu lassen, da Fäulnisbakterien auftreten und die Entwicklung des *Bacillus* beeinträchtigen könnten.

²⁾ Weizenstärke scheint nach übrigens einem nur einmal gemachten Versuch nicht so glatt zu vergähren als Kartoffelstärke.

³⁾ Ausserdem entstand, wie bei fast all diesen Gährungen, eine Spur einer mit Wasserdämpfen flüchtigen, festen höheren Fettsäure; die Menge reichte diesmal zu einer Schmelzpunktsbestimmung aus; derselbe liegt bei 56° C.

⁴⁾ Nach der alten Methode erhielt Bensch aus 100 Rohrzucker 27.4 concentrirte Buttersäure.

dazwischen liegende Fraction 12) bestand nur aus 1.22 pCt. Kalksalz. Der Sprung zeigt, dass sich die Säuren durch fractionirtes Auffangen ziemlich scharf trennen lassen.

Die Stärkegährung mittelst des *Bacillus subtilis* 1) ist eine vortreffliche Methode zur Darstellung von Buttersäure. Die verschiedenen Vorzüge derselben vor der alten, trotz ihrer Plumpheit seit 3 Decennien unverändert beibehaltenen Käse-Methode 2) sind einleuchtend. Handelt es sich um Darstellungen im Grossen, so kann man die Quantitäten der Nährsalze bedeutend herabsetzen, doch wohl nicht unter $\frac{1}{3}$ der oben angegebenen Mengen. Was die Temperatur anlangt, so ist es wohl nicht unbedingt nöthig, die Temperatur von 40° C. einzuhalten; doch möchte es gerathen sein, wenigstens in der Zeit, die vergeht von der Aussaat bis zum Beginn der Gährung — es ist das die Periode der raschen Vermehrung der Bacillen; man könnte sie auch die Incubationszeit nennen; sie dauert 12—24 Stunden — die Temperatur wo möglich nicht unter 35° sinken zu lassen; es ist nämlich nach den Untersuchungen von Eidam 3) die Temperatur 30 bis 35° das Temperaturoptimum für *Bacterium Termo*, das der Entwicklung des *Bacillus* schaden könnte; bei 40° verfällt es in Wärmestarrre; vom Beginn der Gährung an kann es wegen Abwesenheit von O nicht mehr schaden.

Um die Buttersäure ganz sicher frei von Essigsäure zu erhalten, ist es wohl am einfachsten, anstatt der theoretischen, nach der Menge des angewandten, kohlen sauren Kalkes berechneten, Menge ClH soviel weniger zu nehmen, als der Essigsäure-Menge entspricht; dieselbe bleibt alsdann im Destillationsgefäss zurück.

Ich halte es für höchst wahrscheinlich, dass bei der Stärkegährung durch den *Bacillus subtilis* die Buttersäure direct entsteht, ohne dass Milchsäure als Zwischenprodukt auftritt. Auch bei der Buttersäuregährung nach der alten Methode mag oft die Buttersäure direct aus dem Zucker entstehen, nämlich dann, wenn in dem rohen Aussaatmaterial, der sauren Milch und dem alten Käse, der *Bacillus subtilis* über das Milchsäureferment überwiegt 4). Da bei der Stärkegährung der *Bacillus subtilis* aus Stärke Buttersäure bildet, so könnte man ihn auch Buttersäureferment nennen, mit demselben Recht, mit dem ich

1) Die Gährung der Stärke mit anderen Fermentorganismen, namentlich dem dicken *Bacillus* und dem Milchsäureferment bleibt weiterer Untersuchung vorbehalten.

2) Es ist wohl kaum nöthig, auszuführen, wie die Gährung nach der alten Methode zu interpretiren ist: Mit der sauren Milch und dem alten Käse führt man alle möglichen Pilze, Nährstoffe und ausserdem eine grosse Menge von überflüssigem Schmutz ein.

3) Cohn's Zeitschrift Bd. I, Heft 3, S. 208 ff.

4) Bei Aussaat eines Gemenges von Spaltpilzen erlangt derjenige das Uebergewicht, der in grösster Zahl in der Aussaat vorhanden ist, vorausgesetzt dass ihm das Medium zugesagt.

ihn in Bezug auf das Glycerin Aethyl-Bacillus nannte; um Confusionen zu vermeiden, ist es jedoch nothwendig, einstweilen mit Pasteur nur solche Fermente Buttersäurefermente zu nennen, die milchsauen Kalk zu buttersaurem Kalk vergähren; der Bacillus subtilis thut dies nicht. Ich möchte hier auch darauf hinweisen, dass unter dem Namen „Milchsäureferment“ von vielen Autoren ein Ding abgebildet und beschrieben wird, das gänzlich verschieden ist von Pasteur's Milchsäureferment; die Betreffenden nehmen ohne Weiteres an, dass, wenn eine Rohrzucker- oder Milchzuckerlösung sauer wird, die Säure Milchsäure sein müsse, und nennen den dabei auftretenden Spaltpilz Milchsäureferment.

Das Ferment, das äpfelsauren Kalk vergährt, ist nichts anderes als der Bacillus subtilis. Auch für die Gährung des äpfelsauren Kalkes möchte es sich empfehlen, die Käse- resp. Bierhefe ¹⁾)-Methode zu verlassen, und nach Zusatz von Nährsalzen eine Spur des reinen Bacillus subtilis auszusäen. Es ist übrigens aus den älteren Angaben über die Gährung des äpfelsauren Kalkes zu schliessen, dass es zwei verschiedene Spaltpilze giebt, die denselben in Gährung versetzen, jeder mit verschiedenen Gährungsprodukten.

Ausser den beiden Bacillen giebt es noch einen Spaltpilz, der Glycerin in Gährung versetzt: Durch die Güte des Hrn. Dr. Ernst Fischer, Privatdocent der Chirurgie, erhielt ich blauen Eiter, mit der Bitte zu versuchen, den Spaltpilz, der vermuthlich den Farbstoff erzeugte, in künstlichen Nährlösungen weiter zu cultiviren. Die Versuche mit minimaler Aussaat in verschiedene Nährlösungen gelangen sehr gut, am besten mit einer Nährlösung, enthaltend milchsauen Kalk und Nährsalze (Salmiak als N-haltigen Nährstoff). Bei dem bestgelungenen Versuch entstand zunächst nicht der Farbstoff selbst, sondern das farblose Reductionsprodukt desselben; nur eine dünne Schicht an der Oberfläche war blau gefärbt. Beim Schütteln mit Luft wurde die Flüssigkeit sofort tiefblau von der Nüance von Kupfervitriollösung. Der Farbstoff ist löslich in Wasser, wird durch Säuren geröthet, durch Alkalien wieder blau; er ist somit ein Lakmus ähnlicher Farbstoff. Zuweilen hat er einen Stich ins Grüne. Der farbstoff erzeugende Spaltpilz, der sich in den künstlichen Nährlösungen auf das Ueppigste vermehrt, besteht aus kleinen, elliptischen Zellen von 1 bis 1½ Mikromillimeter Länge und unmessbarer Breite; die Zellen sind gewöhnlich paarweise zusammen, oder auch vereinzelt ²⁾).

¹⁾ Selbstverständlich ist es nicht die Bierhefe, die hier Gährung erregt, sondern die derselben beigementen Spaltpilze.

²⁾ Vgl. Cohn's Zeitschrift, Bd. I, Heft 2: J. Schröter, S. 122—124; F. Cohn, S. 156 u. 157.

Weit interessanter als der Farbstoff, ist der Umstand, dass der Spaltpilz Glycerin in Gährung versetzt. Bei einem vorläufigen größeren Gahrversuch mit 100 Gr. Glycerin constatirte ich unter den Gahrungsprodukten Bernsteinsäure, die ich bei den Glyceringahrungen mittelst der beiden Bacillen niemals antraf. Diese Gährung wird noch genauer untersucht werden.

Erklahrung der Abbildungen auf beifolgender Tafel: Vergrößerung 750. Hartnack's Immersionssystem No. X, Ocular No. 3. Zeichnung aus freier Hand.

- Fig. 1. Aethyl-Bacillus. a Dauersporen.
 - 2. Butyl-Bacillus. - -
 - 3. neues Buttersäureferment.
-

10. A. P. N. Franchimont: Ueber das Betulin.

(Eingegangen am 27. December.)

Soeben kam mir die *Gazetta chimica* Fasc. X, 1877 zu Händen und erfuhr ich aus diesen Blättern, dass die HH. Patern und Spica sich mit dem Betulin beschäftigt haben. Dies veranlasst mich zu der Mittheilung, das Hr. Wigman in meinem Laboratorium schon einige Monate mit dem Betulin gearbeitet hat; durch verschiedene wasserentziehende und Reductionsmittel hat er versucht, aromatische Kohlenwasserstoffe zu bekommen. Dieses ist auch theilweise gelungen und schon hat er, durch Oxydation derselben mittelst Chromsäurelösung, eine Säure bekommen, die aber noch nicht rein ist. Nicht um ihm die Priorität zu wahren, sondern nur um Hrn. Wigman, der sich bereits eine grosse Menge des Materials verschafft hat und unabhängig zu ähnlichen Resultaten als die genannten Herren gelangt ist, zu rechtfertigen, wenn er diese Arbeit, welche er zu seiner Promotion gebrauchen will, fortsetzt, soll diese Anzeige dienen.

Leiden, den 25. December 1877.

11. C. F. Mabery u. C. Loring Jackson: Ueber Parajodbenzylverbindungen.

(Eingegangen am 29. December; verl. in der Sitzung von Hrn. A. Pinner.)

Parajodbenzylbromid $C_6H_4JCH_2Br$. Darstellung. Parajodtoluol (Schmelzpunkt 35°), nach Körner ¹⁾ bereitet, wurde mit Bromdampf in der Hitze nach der schon in einer vorigen Abhandlung ²⁾ beschriebenen Methode behandelt; wenn das Parajodtoluol sehr sorgfältig gereinigt wurde, so gelang die Bromirung leicht und

¹⁾ Bull. Acad. Roy. Belg. [2], 24, S. 157.

²⁾ Diese Berichte IX, 931.