

ist. Auch *m*-Dinitrobenzol reagirt ganz glatt mit Natriummethylat, unter Bildung einer amorphen, gelben Substanz. — In gleicher Weise gedenke ich noch andere Nitrokörper, vor Allem auch Nitrosäuren zu untersuchen, ebenso wie an Stelle von Methylalkohol Gemische desselben mit höheren Alkoholen und diese selbst treten sollen. Die Einwirkung der Alkoholate scheint mit dem wachsenden Molekulargewichte der Alkohole an Heftigkeit zuzunehmen; so wird z. B. Natriumamylat von Nitrobenzol ganz ungemein lebhaft und unter plötzlichem Festwerden der ganzen Masse angegriffen.

#### 174. Albert Fitz: Ueber Spaltpilzgährungen.

VII. Mittheilung.

(Eingegangen am 6. April.)

*Bacillus butylicus.*

Reincultur.

Die zur Cultur von Spaltpilzen bestimmten Flüssigkeiten müssen auf 110° C. erhitzt werden. Die Temperatur von 100° reicht zum Sterilisiren nicht aus, da es Spaltpilzsporen giebt, die dieser Temperatur widerstehen. Bequemer als in zugeschmolzenen Röhren nimmt man das Erhitzen auf 110° im Dampfkessel vor; er ist unentbehrlich, wenn es sich um eine grosse Zahl kleiner Versuchsfläschchen oder um eine grosse Flüssigkeitsmasse z. B. 6 Liter handelt, wie sie nothwendig ist, wenn man die Gährungsprodukte genauer untersuchen will<sup>1)</sup>.

Als Culturflüssigkeiten nehme ich Lösungen von 3 pCt. Zucker, Mannit, Glycerin u. s. w. 1 p. m. Fleischextrakt nebst einer entsprechenden Menge von reinem Calciumcarbonat.

<sup>1)</sup> Mein Dampfkessel ist im Innern 54 cm hoch und 38 cm breit; er kann mittelst Siebböden je nach Bedürfniss in 1 oder 2 Etagen abgetheilt werden.

Die Angabe von Robert Koch, Gaffky und Löffler (Mittheilungen aus dem kaiserlichen Gesundheitsamt Bd. I, S. 322 ff.), dass Flüssigkeiten im Dampfkessel nur ausserordentlich langsam die Temperatur des Dampfes annehmen, kann ich nicht bestätigen. Die Zahlenangaben von Koch und Gen. sind physikalische Ungeheuerlichkeiten. Vermuthlich sind die von ihnen benutzten Maximumthermometer unbrauchbar, oder die Dampftemperatur wurde unrichtig bestimmt.

Der Raumersparniss wegen unterlasse ich die Beschreibung meiner Versuche über diesen Gegenstand, der von keinem weiteren Interesse ist. Das Anwärmen meines Dampfkessels bis zur Temperatur von 110° dauert je nach dem Gasdruck und der Menge der Flüssigkeit 30 bis 45 Minuten; alsdann wird er noch 30 Minuten lang auf dieser Temperatur erhalten.

Bevor die mit den Culturflüssigkeiten beschickten Kölbchen in den Dampfkessel eingesetzt werden, erhalten sie den Brefeld'schen Filtrirpapierverschluss, eine Kapsel, bestehend aus 3 bis 4 Blättern von möglichst dichtem Filtrirpapier. Ueber die Kapsel wird ein Kautschukbändchen gespannt.

Die sterilisirten Culturflüssigkeiten, in ein Thermostat von 37° gesetzt, bleiben monatelang pilzfrei.

Das Abnehmen der Kapseln zum Zwecke von Aussaaten oder von Probeentnahmen für die mikroskopische Untersuchung geschieht in einem geräumigen Glaskasten, in welchem die Luft stets mit Feuchtigkeit gesättigt ist und folglich Pilzkeime nur in minimaler Zahl suspendirt enthält.

Ich überzeugte mich davon, dass man sterilisirte Culturflüssigkeiten lange Zeit offen im feuchten Glaskasten stehen lassen kann, ohne dass Pilzkeime hineingerathen.

Der Boden des Glaskastens ist mit destillirtem Wasser bedeckt, die Seitenwände mit Filtrirpapier belegt, das eine grosse Oberfläche bildet, von dem aus das Wasser verdunsten kann. Einige Centimeter über dem Boden befindet sich ein zweiter durchlöcherter Boden.

Das Entnehmen von Proben geschieht mittelst Glasstäbe, die durch die Flamme gezogen und im feuchten Glaskasten erkaltet sind.

Um eine Reincultur eines gährungsregenden Spaltpilzes zu gewinnen, ist es unbedingt nothwendig, von einer einzigen Zelle als Aussaat auszugehen.

Man bestimmt in einer gewöhnlichen, noch unreinen Cultur mit Hülfe einer Zählkammer annähernd die Zahl der Spaltpilzzellen, die in einem Tropfen enthalten sind und verdünnt dann einen Tropfen so stark mit sterilisirtem, destillirtem Wasser, dass im Durchschnitt auf 5 bis 10 Tropfen der verdünnten, gut gemischten Flüssigkeit eine Spaltpilzzelle kommt. Man sät dann in eine Serie von ca. 50 mit Culturflüssigkeit beschickten und sterilisirten Kölbchen je einen Tropfen aus und setzt sie alsdann in ein Thermostat von 37°. Von den 50 Kölbchen werden im Laufe der nächsten drei Wochen 5 bis 10 Kölbchen Pilzentwicklung zeigen. In einem jeden dieser Kölbchen wird die Pilzcultur unter sich einheitlich und rein sein, weil sie von einer einzigen Zelle abstammt. Man erhält so die verschiedenen Spaltpilze, die in der ursprünglichen unreinen Cultur enthalten waren, jeden für sich isolirt.

Hat man den Spaltpilz einmal rein, so ist es leicht, ihn bei weiteren Culturen rein zu erhalten. Verschiedene kleine Vorsichtsmaassregeln, die dabei zu beachten sind, sind so selbstverständlich, dass ich sie wohl nicht zu erwähnen brauche.

### Temperaturoptimum.

Es wurden 4 Thermostate auf die Temperaturen 31°, 34°, 37°, 40° eingestellt. Während der ganzen Dauer der Versuche (4 Wochen) schwankte die Temperatur in der Regel nur um 0.1°, ausnahmsweise für kurze Zeit um 0.2°; bei einem der Thermostate kam auch einmal für kurze Zeit eine Abweichung von 0.3° vor.

Die Temperatur von Wasser, das sich in einem Kolben im Thermostat befindet, weicht von der aussen abgelesenen Temperatur um 0.1° bis 0.2° ab.

Das Temperaturoptimum wurde zu ermitteln gesucht durch die Gewichtsverluste der Gährflüssigkeiten.

Um Kork- oder Kautschukstöpsel zu vermeiden, wurde der Hals des Kolbens zu einer dünnen Röhre ausgezogen, rechtwinkelig gebogen und ein angemessen grosses, U-förmiges Chlorcalciumrohr damit verbunden, das am anderen Ende durch ein Kautschukventil geschlossen wurde.

Um zu prüfen, ob diese Vorrichtung überhaupt für den vorgesezten Zweck brauchbar ist, wurden die vier Apparate mit destillirtem Wasser beschickt und 4 Tage lang in die Thermostate eingestellt. Mittelst der Wage, die ich für diese Versuchsreihe anwandte und die ein Uebergewicht von 0.1 g deutlich anzeigte, konnte eine Gewichtsänderung nicht constatirt werden. Die Versuchsanordnung war somit befriedigend brauchbar.

Es wurden nun die vier Kolben mit je 400 ccm Gährflüssigkeit (enthaltend 3 pCt. Glycerin, 1 p. m. Fleischextrakt und eine angemessene Menge Calciumcarbonat) beschickt und nebst den Kautschukröhrchen im Dampfkessel sterilisirt. Die Kolben wurden sodann auf die betreffenden Temperaturen gebracht, vorsichtig mit Aussaat von reinem *Bacillus butylicus* versehen, mit den Chlorcalciumröhren verbunden und gewogen.

Nach 4 Wochen betragen die Gewichtsverluste in Grammen:

31°	34°	37°	40°
3.2	3.5	3.7	4.2.

Von den untersuchten Temperaturen ist somit 40° die günstigste.

### Temperaturmaximum.

Es wurden zwei Thermostate auf die Temperaturen 42° und 46° eingestellt und zwei Kölbchen mit sterilisirten Glycerinfleischextraktlösungen<sup>1)</sup> eingesetzt. Nachdem die Kölbchen hinreichend lange darin verweilt hatten, um die betreffenden Temperaturen anzunehmen, wurden sie mit reiner Aussaat versehen.

<sup>1)</sup> Selbstverständlich enthielten die Kölbchen auch Calciumcarbonat.

Bei 42° trat Pilzvermehrung und stürmische Gährung ein. Bei 46° trat selbst nach 3 Wochen keine Pilzvermehrung ein; die Aussaat blieb regungslos. Letzteres Kölbchen wurde dann in ein Thermostat von 37° gebracht; alsbald trat Pilzvermehrung und Gährung ein. Die Grenze liegt also zwischen 42° und 46°. Zur genaueren Bestimmung der Grenze ging ich von 42° an aufwärts mit Intervallen von 0.4 bis 0.5°. Die Fähigkeit, sich zu vermehren und Gährung zu erregen, nimmt dabei *gradatim* ab. Soweit meine Versuche bis jetzt reichen, liegt die Grenze zwischen 45° und 45.5°; es ist übrigens wohl möglich, dass die Grenze ein wenig schwankt je nach dem Medium und je nachdem die Zellen der Aussaat bereits mehr oder weniger gut an die hohe Temperatur angepasst waren.

### Tödtung der Dauersporen.

Die Dauersporen des *Bacillus butylicus* können die Siedetemperatur einige Minuten lang ertragen<sup>1)</sup>. Die Zeit wurde ein wenig verschieden gefunden, wie es scheint, je nach dem Alter und der Qualität der Sporen und je nach dem Medium<sup>2)</sup>.

Bei drei Versuchsreihen mit sterilisirten und mit reiner Sporenaussaat versehenen Glycerinflischextraktlösungen wurden folgende Grenzen gefunden: 1) zwischen 3 und 5 Minuten, 2) zwischen 6 und 10 Minuten, 3) zwischen 15 und 20 Minuten.

Bei einer Mannitreihe lag die Grenze zwischen 6 und 10 Minuten.

Bei zwei Traubenzuckerreihen lag die Grenze in dem einen Fall zwischen 3 und 6 Minuten, in dem zweiten Fall zwischen 10 und 15 Minuten.

Die Dauersporen werden auch schon weit unter 100° getödtet, wenn sie genügend lange Zeit den betreffenden Temperaturen ausgesetzt werden.

Die Versuche wurden so gemacht, dass die Kölbchen mit Zimmertemperatur in Thermostate, die auf 70°, 80°, 90°, 95° eingestellt waren, verschieden lange Zeit gesetzt wurden<sup>3)</sup>. Bei 95° liegt die Grenze zwischen 2 und 6 Stunden, bei 90° zwischen 6 und 11 Stunden, bei 80° zwischen 7 und 11 Stunden. Bei 70° ist nach 12 Stunden die Keimfähigkeit noch nicht vernichtet.

<sup>1)</sup> Die Flüssigkeiten wurden direkt über der Flamme zum Kochen erhitzt.

<sup>2)</sup> Vielleicht sind auch bei der Interpretation von Versuchen, die zu verschiedener Zeit gemacht werden, die kleinen durch verschiedenen Barometerstand bedingten Siedepunktdifferenzen nicht ausser Acht zu lassen.

<sup>3)</sup> Einige Controllversuche ergaben, dass die Temperatur der Flüssigkeit im Kölbchen nach 1 Stunde noch 10° unter der Temperatur des Thermostaten ist.

Die gegebenen Zahlen beziehen sich auf Glycerinfleischextraktlösungen. In Traubenzuckerlösungen<sup>1)</sup> ist die Widerstandsfähigkeit geringer. Versuche, die gleichzeitig unter genau denselben Verhältnissen mit dem nämlichen Aussaatmaterial gemacht wurden, ergaben: Bei 95° sind nach 2 Stunden die Sporen in Glycerinlösung noch keimfähig, in Traubenzuckerlösung bereits todt. Bei 90° sind nach 6 Stunden die Sporen in Glycerinlösung noch keimfähig, in Traubenzuckerlösung todt.

Auch in Glycerinsalmiaklösungen<sup>2)</sup> sind die Sporen weniger widerstandsfähig als in Glycerinfleischextraktlösungen. So liegt für Glycerinsalmiaklösungen bei 90° die Grenze zwischen 2½ und 3 Stunden, während sie für Glycerinfleischextraktlösungen zwischen 6 und 11 Stunden liegt.

#### Aethylalkoholgrenze.

Nach zwei orientirenden Vorversuchen wurde folgende Versuchsreihe gemacht. Es wurden 6 Kölbchen mit Glycerinfleischextraktlösung und steigenden Alkoholmengen beschickt. Das erste Kölbchen enthielt 3.5 Gewichtsprocente Alkohol, das zweite 4, die folgenden 4.5, 5, 5.5, 6.

Das erste Kölbchen (3.5 pCt.) zeigte 8 Tage nach der Aussaat Pilzvermehrung, nach weiteren 5 Tagen trat sehr schwache Gärung ein. Das zweite Kölbchen (4 pCt.) zeigte 13 Tage nach der Aussaat Pilzvermehrung; nach weiteren 6 Tagen trat eine kaum merkliche Gärung ein. Das dritte Kölbchen (4.5 pCt.) zeigte nach 16 Tagen Pilzvermehrung; Gärung trat nicht ein. In den übrigen Kölbchen war nach 3 Wochen, wo der Versuch abgebrochen wurde, keine Pilzvermehrung eingetreten.

Bei der Interpretation der Versuchsreihe ist zu beachten, dass Alkohol verdunstet, und zwar ist die Menge desselben beträchtlich.

Bei Beendigung der Versuchsreihe wurde in allen 6 Kölbchen das Gesamtvolumen Flüssigkeit und die Menge des noch vorhandenen Alkohols bestimmt; ich will nur die Zahlen anführen, die hier von Interesse sind. Das dritte Kölbchen enthielt noch 2.7 Gewichtsprocente Alkohol; das folgende Kölbchen, in welchem keine Pilzvermehrung mehr eingetreten war, noch 3.3.

Die Grenze liegt also zwischen 2.7 und 3.3 Gewichtsprocenten Alkohol.

<sup>1)</sup> Dieselben werden im Dampfkessel ziemlich stark gebräunt.

<sup>2)</sup> Man darf die Versuche erst nach mehreren Wochen abbrechen, da es zuweilen sehr lange dauert, bis die Sporen in Glycerinsalmiaklösung auskeimen.

### Butylalkoholgrenze.

Nach einem orientirenden Vorversuch wurden 4 Kölbchen mit Glycerinfleischextraktlösung und steigenden Mengen von normalem Butylalkohol versehen; das erste Kölbchen enthielt 0.7 Gewichtsprocente, das zweite 0.9, das dritte 1.05, das vierte 1.2. Nach der Aussaat wurden die Kölbchen zugeschmolzen. Nach 3 Wochen wurde die Versuchsreihe abgebrochen. In dem ersten und zweiten Kölbchen war Pilzvermehrung (ohne merkliche Gährung) eingetreten, in dem dritten und vierten Kölbchen nicht.

Die Grenze liegt also zwischen 0.9 und 1.05 Gewichtsprocenten Butylalkohol.

### Buttersäuregrenze.

Es wurden 3 Kölbchen mit Glycerinfleischextraktlösung und mit 0.05, 0.1 und 0.2 pCt. Buttersäure beschickt und mit Aussaat versehen. In dem ersten Kölbchen trat Pilzvermehrung ein, in dem zweiten und dritten nicht mehr.

Die Grenze liegt also zwischen 0.05 und 0.1 pCt. Buttersäure.

### Glyceringrenze.

3 Kölbchen wurden mit Fleischextraktlösung, Calciumcarbonat und 15, 20, 25 pCt. Glycerin beschickt, sterilisirt und mit Aussaat versehen. In allen Kölbchen trat Pilzvermehrung ein, im dritten erst nach 4 Tagen. In den zwei ersten Kölbchen trat mässige Gährung ein, in dem dritten keine merkliche Gährung. Bei Beendigung der Versuchsreihe roch das erste und zweite Kölbchen stark nach Butylalkohol, das dritte äusserst schwach.

Die Glyceringrenze liegt also noch über 25 pCt.

### Kleine morphologische Notizen.

Die Breite der Vegetationszellen variiert ziemlich je nach dem Alter und je nach der Zusammensetzung der Culturflüssigkeit; in jüngerem Zustand sind sie dünner als in späterem Alter; in eiweisshaltigen Nährlösungen sind sie dünn und lang; bei hohem Gehalt an Glycerin sind sie sehr dick.

Ziemlich auffallend ist die Aufbauchung der Zellen, die in der Regel (indess nicht immer) auf dem Höhepunkt der Gährung eintritt; sie erinnert sehr an einen ähnlichen Vorgang bei dem Schimmelpilz *Mucor racemosus*, bei welchem die Mycelzellen tonnenförmig anschwellen, sobald der in der Zuckerlösung absorbirte Sauerstoff verbraucht ist und in Folge dessen die Gährung beginnt.

In sehr seltenen Fällen bei ungünstigen Ernährungsbedingungen findet man Zellen, die wurstförmig und selbst hackenförmig gekrümmt sind.

Der Spaltpilz bildet keine Zooglocamassen und keine Haut auf der Oberfläche.

Die Violettfärbung durch Jod findet nicht in jüngerem Zustand, sondern erst in späterem Alter statt, wenn die Zellen sich anschicken, in Dauersporen überzugehen.

In eiweisshaltigen Kulturflüssigkeiten erhält sich die Vegetationsform wochenlang, bevor sie sich anschickt, in Dauersporen überzugehen, ebenso in Kulturflüssigkeiten, die mit grossen Mengen von Glycerin, Aethylalkohol und Butylalkohol<sup>1)</sup> beschickt waren.

Zuweilen gehen die Vegetationszellen ausserordentlich rasch, schon 2 bis 3 Tage nach ihrer Bildung, in Dauersporen über, auch wenn alle Nährstoffe reichlich im Ueberschuss vorhanden sind; besonders ist dies der Fall bei dem Spaltpilz in der gährungsunfähigen Form<sup>2)</sup>.

In sehr seltenen Fällen, wie es scheint unter abnormen Ernährungsbedingungen, erreichen einzelne Dauersporen die doppelte bis dreifache Länge der normalen; zuweilen sind diese langen Dauersporen schwach gekrümmt, wurstförmig.

Das Auskeimen der Dauersporen habe ich nicht direkt gesehen. Die Sporen schwellen nach Aussaat in frische Kulturflüssigkeit an, verlieren ihren Glanz und nehmen dreieckige Form an; aus letzterer ist mit einiger Wahrscheinlichkeit anzunehmen, dass sie quer zur Längsaxe der Sporen auskeimen, ebenso wie die Sporen des ordinären aërobischen Heu-Bacillus nach Brefeld's Beobachtung.

#### Vergärbare Substanzen.

Von dem *Bacillus butylicus* werden in Gährung versetzt: Glycerin, Mannit, Rohrzucker.

In Lösungen von milchsaurem Kalk, milchsaurem Ammoniak, glycerinsaurem Kalk, Erythrit, äpfelsaurem Kalk, weinsaurem Kalk, weinsaurem Ammoniak, citronensaurem Kalk, Milchzucker, Quercit, chinasaurem Kalk vermehrt sich zwar der Spaltpilz, er erregt jedoch keine Gährung, d. h. er kann bei Abwesenheit von Sauerstoff in diesen Lösungen nicht leben.

Wie steht es nun bei den vergärbaren Substanzen mit den Gährungsprodukten? Sind die Gährungsprodukte verschieden je nach den vergärbaren Substanzen, oder sind sie die nämlichen und nur die relativen Mengen derselben verschieden? Bildet sich ausschliesslich Butylalkohol und keine Spur von Aethylalkohol, ausschliesslich Buttersäure und keine Spur von Essigsäure und Capronsäure? Bildet sich Bernsteinsäure?

<sup>1)</sup> Diese Beobachtung stimmt nicht mit einer früheren Angabe (diese Berichte X, 276); ich muss den Widerspruch einstweilen unaufgeklärt lassen.

<sup>2)</sup> Siehe weiter unten.

Es wurde eine Gährflüssigkeit hergestellt von 6 L Wasser, 180 g Glycerin, 0.1 g phosphorsaurem Kali, 0.02 g schwefelsaurer Magnesia, 1 g Salmiak und 30 g reinem Calciumcarbonat. Die Flüssigkeit wurde im Dampfkessel auf 110° C. erhitzt und nach dem Erkalten mit reiner Aussaat versehen.

Die Gährung dauerte 21 Tage. Alle vier Tage wurde mit der nöthigen Vorsicht eine Probe zur mikroskopischen Untersuchung entnommen; letztere ergab nichts Abnormes.

Die Menge des wasserfreien Rohalkohols betrug 14.6 g; er siedete bei 115—117½°, abgesehen von 0.4 g Vorlauf, der von 85° bis 115° überging. Mit 117½° war das Destillationskölbchen leer. Ausser Butylalkohol hatte sich also eine minimale Menge von Aethylalkohol gebildet.

Die nach dem Abdestilliren des Alkohols restirende Flüssigkeit wurde mit der nach der Menge des angewandten Calciumcarbonats berechneten Menge Salzsäure versetzt und destillirt.

Die Menge der flüchtigen Säure, durch Titiren bestimmt und als Buttersäure berechnet, betrug 31.3 g.

Aus dem letzten Destillat wurde zur Prüfung auf Essigsäure das Silbersalz dargestellt; es gab 64.7 pCt. Ag (essigsäures Silber verlangt 64.7 pCt. Ag); das Silbersalz, aus dem vorletzten Destillat, gab 62.3 pCt. Ag.

Die Hauptmenge der flüchtigen Säure wurde in bekannter Weise verarbeitet und der fraktionirten Destillation unterworfen; es ging fast Alles bei 160—165° über; die Menge der letzten von 165° bis circa 200° siedenden Fraktion betrug 1.2 g.

Die flüchtige Säure besteht also wesentlich aus Buttersäure; nebenbei hatte sich eine minimale Menge von Essigsäure und Capronsäure gebildet.

Aus dem nach dem Abdestilliren der flüchtigen Säure bleibenden Rückstand ist die nichtflüchtige Säure mittelst Aether auszuschütteln; es ist das ausserordentlich zeitraubend; besser ist es, folgenden Weg einzuschlagen: Man fällt den Kalk mittelst Soda aus, engt das Filtrat ein, zuletzt auf dem Wasserbad zur Trockne und zieht wiederholt mit absolutem Alkohol aus. Das Kochsalz bleibt ungelöst; in Lösung gehen milchsaures Natron und Trimethylenalkohol. Nach dem Entfernen des Alkohols wird der Rückstand in Wasser gelöst, angesäuert und wiederholt mit Aether ausgeschüttelt. Der Aether nimmt Milchsäure und ein wenig Trimethylenalkohol auf. Das Zinksalz der Milchsäure wurde nach mehrmaligem Umkrystallisiren in farblosen, gut ausgebildeten Kryställchen erhalten. Die Menge betrug 5.11 g; dies entspricht 3.1 g Milchsäure. Die Analyse ergab:



	Gefunden		Berechnet
	I.	II.	
H <sub>2</sub> O	18.36	18.1	18.2 pCt.
Zn	27.0	26.7	26.8 »

Nach dem Ausschütteln mit Aether wurde die rückständige Flüssigkeit mit Soda genau neutralisirt, eingeengt, zuletzt auf dem Wasserbad zur Trockne und wiederholt mit absolutem Alkohol ausgezogen. Nach dem Entfernen des Alkohols hinterblieb eine syrupförmige Flüssigkeit, die bei 213—217° siedete und ohne Zweifel identisch ist mit dem Freund'schen Trimethylenalkohol; die Menge desselben betrug 6.1 g. Für die Mannitgährung wurden 180 g Mannit und 45 g Calciumcarbonat angewandt. Die Gährung begann erst 11 Tage nach der Aussaat <sup>1)</sup> und dauerte 15 Tage. Die alle 3 bis 4 Tage vorgenommene mikroskopische Untersuchung ergab nichts Abnormes.

Die vergohrene Flüssigkeit reagirte sauer trotz des Ueberschusses von Calciumcarbonat <sup>2)</sup>.

Das wässrige alkoholische Destillat reagirte sauer und enthielt 1.02 g Buttersäure.

Die Menge des wasserfreien Roh-Alkohols betrug 18.25 g; er siedete fast vollständig bei 116—118°; unter 116° von 85° an beginnend gingen nur einige Tropfen über. Mit 118° war das Destillationskölbchen leer.

Der Alkohol besteht also aus Butylalkohol mit einer Spur Aethylalkohol.

Die Menge der flüchtigen Säure, als Buttersäure berechnet, betrug 63.8 g. Das letzte Destillat gab ein Silbersalz mit 55.5 pCt. Silber (Buttersaures Silber verlangt 55.4 pCt. Silber). Die Hauptmenge der Säure wurde in bekannter Weise verarbeitet; sie siedete fast vollständig bei 160—164°; die letzten Tropfen gingen bei 165° über.

Die flüchtige Säure ist also ganz reine Buttersäure ohne Beimengung von Essigsäure und Capronsäure.

Die Menge des milchsauren Zinks beträgt 1.21 g entsprechend 0.73 g Milchsäure.

Nach dem Behandeln mit absolutem Alkohol wurde das Kochsalz mit 85procentigem Alkohol wiederholt ausgezogen; nach dem Entfernen des Alkohols wurde der Rückstand in Wasser gelöst, angesäuert und mit Aether ausgeschüttelt; es wurde so 0.01 g Bernsteinsäure gewonnen.

<sup>1)</sup> Bei Anwendung von Salmiak als stickstoffhaltigem Nährstoff und bei minimaler Aussaat findet die Pilzvermehrung anfangs zuweilen sehr langsam statt.

<sup>2)</sup> Bei mehrtägigem Stehen würde übrigens ohne Zweifel die Flüssigkeit neutral geworden sein.

Ausser milchsaurem und bernsteinsaurem Natron wurde von dem Alkohol eine kleine Menge einer braunen, schmierigen, hygroskopischen, in Aether unlöslichen Substanz, die Fehling'sche Lösung reducirt, ausgezogen.

Zur Rohrzuckerghärung wurden 180 g Rohrzucker und 70 g Calciumcarbonat genommen. Die Gähung begann 8 Tage nach der Aussaat und dauerte 25 Tage.

Die vergohrene Flüssigkeit reagirte sauer; das alkoholische Destillat enthielt 0.3 g Buttersäure.

Die Menge des Rohalkohols betrug 0.92 g; er siedete fast vollständig bei 110—118°; unter 110° von 85° an beginnend gingen drei Tropfen über.

Der Alkohol besteht also wesentlich aus Butylalkohol.

Die Menge der flüchtigen Säure, als Buttersäure berechnet, betrug 80.4 g.

Das letzte Destillat gab ein Silbersalz mit 64.3 pCt. Ag; es ist also Essigsäure vorhanden. Die Hauptmenge der Säure siedete fast ganz bei 160—165°; eine minimale Menge ging bei 165—175° über; es ist also eine sehr kleine Menge Capronsäure vorhanden<sup>1)</sup>.

Die Menge des milchsauren Zinks betrug 0.82 g, entsprechend 0.49 g Milchsäure.

Bernsteinsäure war nur spurenweise vorhanden.

Ausserdem war vorhanden eine kleine Menge einer braunen, schmierigen, hygroskopischen, Fehling'sche Lösung reducirenden Substanz.

Im folgenden stelle ich die Resultate, auf 100 Theile berechnet, übersichtlich zusammen:

Es gaben:	100 Glycerin	100 Mannit	100 Invertzucker
Butylalkohol . . . .	8.1	10.2	0.5
Buttersäure . . . .	17.4	35.4	42.5
Milchsäure . . . .	1.7	0.4	0.3
Bernsteinsäure . . .	—	0.01	Spur
Trimethylenalkohol .	3.4	—	—
	30.6	46.0	43.3

<sup>1)</sup> Wie schon in früheren Mittheilungen erwähnt, entsteht bei all' diesen Gähungen eine Spur einer höheren, festeren Fettsäure, die mit den Wasserdämpfen flüchtig ist und das Destillat trübt. Speciell bei der Rohrzuckerghärung war die Menge grösser, als bei der Glycerin- und Mannitghärung.

Die Verschiedenheiten der drei Gärungen treten vielleicht am deutlichsten hervor, wenn man folgende Vergleiche macht: Bei der Glycerin-gärung ist das Molekülverhältniss von Alkohol und Säure (Buttersäure und Milchsäure zusammengerechnet) wie 1 : 2, bei der Mannit-gärung wie 1 : 3; bei der Rohrzuckergärung ist der Alkohol nur minimales Nebenprodukt.

#### Verlust der Fähigkeit, Gärung zu erregen.

Der *Bacillus butylicus* kann die Fähigkeit, Gärung zu erregen, d. h. bei Abwesenheit von Sauerstoff zu leben, durch verschiedene Einflüsse verlieren.

Einer dieser Einflüsse ist hohe Temperatur. Eine Serie von sterilisirten, mit reiner Sporenaussaat versehenen Glycerinfleischextrakt-lösungen wurden verschieden lange Zeit gekocht, nämlich 1, 3, 6, 10, 15, 20 Minuten. Nur in den zwei ersten Kölbchen trat Pilzvermehrung ein, in den übrigen waren die Sporen todt. In dem Kölbchen »1 Minute« trat Gärung ein, in dem Kölbchen »3 Minuten« dagegen nicht.

Bei einer anderen Versuchsreihe, wobei die nämlichen Zeiten eingehalten wurden, trat in den drei ersten Kölbchen Pilzvermehrung ein; in den übrigen waren die Sporen todt. In keinem einzigen der drei ersten Kölbchen trat Gärung ein.

Genau dasselbe Resultat gab eine Serie von Mannitfleischextrakt-lösungen; in den drei ersten Kölbchen trat Pilzvermehrung, aber keine Gärung ein; in den übrigen Kölbchen waren die Sporen todt.

Eine Serie Traubenzuckerfleischextraktlösungen (1, 3, 6, 10, 15, 20 Minuten) ergab: In den vier ersten Kölbchen Pilzvermehrung, die zwei letzten todt. Die Kölbchen »1 Minute« und »3 Minuten« gähren; die Kölbchen »6 Minuten« und »10 Minuten« gähren nicht.

Eine andere Traubenzuckerserie (1, 3, 6, 10 Minuten) ergab: In den zwei ersten Kölbchen Pilzvermehrung, aber keine Gärung; die zwei letzten Kölbchen todt.

Die Fähigkeit, Gärung zu erregen, kann auch schon unter 100° verloren gehen.

Zwei Kölbchen mit Glycerinfleischextraktlösung wurden 2 und 6 Stunden lang in ein Thermostat von 95° eingesetzt. In dem Kölbchen »2 Stunden« trat Pilzvermehrung, aber keine Gärung ein; in dem Kölbchen »6 Stunden« waren die Sporen todt.

Eine Serie von Kölbchen mit Glycerinfleischextraktlösungen wurden 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 11 Stunden in ein Thermostat von 90° eingesetzt. Mit Ausnahme des letzten trat in allen Kölbchen Pilzvermehrung ein. In den drei ersten Kölbchen trat Gärung ein mit deutlich abnehmender Intensität; in den übrigen Kölbchen trat keine Gärung ein.

Zwei Versuche bei 80° ergaben: Nach 7 Stunden tritt noch Pilzvermehrung, aber keine Gährung mehr ein.

Bei 70° ist nach 12 Stunden die Gährfähigkeit noch nicht aufgehoben.

Die Fähigkeit, Gährung zu erregen, wird ausser durch hohe Temperatur auch aufgehoben, wenn dem Spaltpilz sehr reichlich und andauernd Sauerstoff dargeboten wird.

Wenn man z. B. eine einzige Zelle in eine verhältnissmässig grosse Menge Kulturflüssigkeit aussät, so wird die Gährfähigkeit beträchtlich herabgestimmt und oft auch ganz aufgehoben.

Ebenso verhält es sich, wenn man den Spaltpilz bei sehr reichlichem Luftzutritt viele Generationen hindurch in einer Kulturflüssigkeit, in welcher er keine Gährung verursachen kann, kultivirt.

Es wurden vier grössere Kolben mit Fleischextraktlösung beschickt, sodass die Flüssigkeit nur eine dünne, der Luft reichlich ausgesetzte Schicht bildete. Die vier Kolben wurden sterilisirt und mittelst eines Platindrathes eine minimale Aussaat in einen derselben gemacht. Nach vier Tagen wurde mittelst des Platindrathes eine Spur der Flüssigkeit in den zweiten Kolben übertragen; so wurde fortgeföhrt bis zum letzten Kolben. Von Letzterem wurde eine Aussaat in eine Glycerinfleischextraktlösung gemacht: es trat Pilzvermehrung, aber keine Gährung ein.

Derselbe Versuch wurde mit vier Kolben mit milchsaurer Kalkfleischextraktlösung gemacht, genau mit dem nämlichen Resultat.

Ferner wird die Gährfähigkeit herabgestimmt durch Kultur bei 45° C.

Die Analogie der gährungserregenden und der krankheiterregenden Spaltpilze ist in die Augen springend. Bei dem Spaltpilz der Hühnercholera und bei dem Milzbrandbacillus kann, wie Pasteur zeigte, die Fähigkeit Krankheit zu erregen gradatim herabgesetzt werden bis zur völligen Aufhebung, und zwar geschieht dies durch Kultur bei sehr reichlichem Sauerstoffzutritt.

#### Enzyme <sup>1)</sup>.

Der *Bacillus butylicus* producirt ein Enzym, das den Rohrzucker inventirt. In eine sterilisirte Rohrzuckerfleischextraktlösung wurde eine minimale Aussaat gemacht und von Zeit zu Zeit Proben entnommen zur Prüfung mit Fehling'scher Lösung. 6 Stunden nach der Aussaat fand noch keine Reduktion statt; nach 24 Stunden wurde

---

<sup>1)</sup> Anstatt des ungeeigneten Ausdruckes »ungeformtes Ferment« oder »unorganisirtes Ferment« benutze ich das von Kühne vorgeschlagene Wort »Enzym«.

starke Pilzvermehrung, Beginn der Gährung und schwache Reduktion konstatirt. Nach 48 Stunden reducirte die Flüssigkeit sehr stark. Eine spätere Wiederholung des Versuches ergab das nämliche Resultat.

Milchzucker wird von dem Spaltpilz nicht in Gährung versetzt und zwar deshalb nicht, weil er kein Enzym bildet, das den Milchzucker hydratisirt. Durch Säure hydratisirter Milchzucker wird durch den Spaltpilz leicht in Gährung versetzt. Der Spaltpilz verhält sich also gegen den Milchzucker ebenso wie Bierhefe und *Mucor racemosus*. Beide letztere vermehren sich zwar in Milchzuckerlösung, erregen aber keine Gährung, weil sie kein Enzym bilden, das den Milchzucker hydratisirt; durch Säure hydratisirter Milchzucker wird durch sie leicht in Gährung versetzt. Sehr wahrscheinlich giebt es Spaltpilze, die ein Enzym produciren, das den Milchzucker hydratisirt; die alkoholische Gährung der Milch, die den Kumys liefert, ist vermuthlich so zu interpretiren: ein Spaltpilz und Bierhefe unterstützen sich gegenseitig; der Spaltpilz (der kein Gährungserreger zu sein braucht) bildet ein Enzym, das den Milchzucker hydratisirt, und die Bierhefe vergährt dann den hydratisirten Milchzucker.

Der Spaltpilz producirt kein Enzym, das den Harnstoff hydratisirt<sup>1)</sup>. Zwei Kölbchen mit Harn wurden bei gewöhnlichem Druck 10 Minuten lang gekocht<sup>2)</sup>; eines der Kölbchen wurde nach dem Erkalten mit Aussaat versehen; das andere diente als Kontrolle. Der Spaltpilz vermehrte sich gut und ging nach einiger Zeit in Dauersporen über. Bei Beendigung des Versuches war der Harn kaum merklich alkalisch. Der Kontrollharn blieb pilzfrei.

<sup>1)</sup> Ich rechne die sogenannte Harnstoffgährung nicht zu den Gährungserscheinungen; sie gehört zu einer ganz anderen Klasse von Erscheinungen, nämlich zu den Hydratationen. — Der Harnstoffspaltpilz bildet ein Enzym, das den Harnstoff hydratisirt, ähnlich wie viele niedere Pilze ein Enzym produciren, das den Rohrzucker invertirt. — Mit Unrecht werden von einigen Autoren die Gährungserscheinungen und die Hydratationen zusammengeworfen und dadurch bei Fernerstehenden, die nicht in der Lage sind sich ein selbstständiges Urtheil über diese Dinge zu bilden, eine heillose Konfusion erzeugt. — Die Gährungserscheinungen und die Hydratationen sind chemisch und physiologisch ganz heterogene Dinge; das Zusammenwerfen rührt wohl nur von dem äusserlichen Umstand her, dass man zufälliger- und unzuweckmässigerweise in beiden Fällen das Agens mit dem nämlichen Wort »Ferment« bezeichnete.

<sup>2)</sup> Im Dampfkessel sterilisirter Harn konnte zu dem Versuch nicht verwendet werden, da bei 110° der Harnstoff schon zersetzt wird; auch in diesem alkalischen Harn vermehrt sich der Spaltpilz gut und geht nach einiger Zeit in Dauersporen über.

Der Spaltpilz bildet kein Enzym, das Stärke verzuckert. Es wurde ein Gemenge von Wasser, Stärke, Fleischextrakt und Calciumcarbonat im Dampfkessel sterilisirt und nach dem Erkalten mit Aussaat versehen. Der Spaltpilz vermehrt sich gut; es tritt jedoch keine Verzuckerung und folglich auch keine Gährung ein. Der Versuch wurde mehrmals wiederholt mit dem nämlichen Resultat.

Ich erinnere hierbei daran, dass ich früher einen Spaltpilz unter den Händen hatte, der Stärke, die nicht einmal verkleistert zu sein braucht, rasch und stürmisch vergährt. Ohne Zweifel wird dabei die Stärke zuerst verzuckert durch ein von dem Spaltpilz producirtes Enzym.

Der Spaltpilz producirt ein Enzym, das unlösliche Eiweissstoffe langsam löst. Serum-Albumin, frisch bereitetes Fibrin, Kleber, fettfreies Casein wurden mit Wasser und Fleischextrakt im Dampfkessel sterilisirt und nach dem Erkalten mit Aussaat versehen. Im Laufe der nächsten Wochen wurden die Substanzen langsam gelöst bis auf einen kleinen Rest. Es fand keine Gasentwicklung statt; es trat kein Faulnissgeruch auf. Diese Versuche erinnern sehr an den Vorgang beim langsamen Reifen des Käses, das ebenfalls, wie es scheint, durch ein von Spaltpilzen producirtes Enzym bedingt wird und wobei, wie es scheint, das Casein hydratisirt wird.

Nach einigen Wochen wurden die Flüssigkeiten untersucht: sie reagiren alkalisch, sie zeigen nicht die Biuretreaktion; beim Kochen findet keine Ausscheidung statt, beim Kochen nach dem Ansäuern nur eine geringe Trübung; durch absoluten Alkohol findet Fällung statt.

In den Kontrollkolbchen waren die Substanzen unverändert geblieben.

Saet man den Spaltpilz in sterilisirte Milch, so vermehrt er sich darin gut. Die Milch wird nicht sauer, sie kann es auch nicht werden, denn der Spaltpilz bildet, wie ich oben zeigte, kein Enzym, das den Milchzucker hydratisirt. Die Milch wird im Gegentheil alkalisch. Das Casein wird ebenso verändert wie in dem oben beschriebenen Versuch. Die Milch nimmt ein eigenthümliches Aussehen an; sie bildet nämlich, abgesehen von der aufschwimmenden Fettschicht und einem geringen Bodensatz, eine nur schwach trübe, fast klare und durchsichtige Flüssigkeit, welche nach dem Ansäuern nur eine geringe Trübung giebt. Die ebenfalls im Dampfkessel sterilisirte Kontrollmilch hat ein normales Aussehen und giebt nach dem Ansäuern eine starke Fällung.

Strassburg, Privatlaboratorium.