

Lässt man bei der Einwirkung der Salpetersäure die Temperatur höher steigen, als angegeben ist, so erhält man ein Gemisch von Diphenyltetrazol mit einem höher schmelzenden Körper, der nach mannigfachem Umkrystallisiren bei 195—196° schmilzt und wahrscheinlich identisch ist mit dem vor Kurzem durch Abbau erhaltenen *p*-Nitrodiphenyltetrazol, das ebenso wie das aus *p*-I-Nitroguanazylobenzol durch  $N_2O_3$  darstellbare Product bei 198—199° schmilzt.

Die Bildung von Diphenyltetrazol ist gleichzeitig ein Beweis für die Constitution der Guanazyverbindungen.

### 78. O. Emmerling: Butylalkoholische Gährung.

[Aus dem I. Berliner Universitäts-Laboratorium.]

(Vorgetragen vom Verfasser.)

Vor einiger Zeit [diese Berichte 29, 2726 (1896)] theilte ich mit, dass es mir bei Wiederholung einiger Fitz'scher Arbeiten nicht gelungen sei, Glycerin durch Kuhexcremente in butylalkoholische Gährung zu versetzen, resp. aus diesem Material den von Fitz beschriebenen bacillus butylicus zu isoliren.

Bei weiterer Verfolgung dieser Arbeiten versuchte ich, ebenfalls nach Fitz's Vorgang, den gesuchten Gährungserreger aus Heu zu gewinnen, hatte jedoch zunächst auch hier nicht den gewünschten Erfolg. Fünfzehn verschiedene Heusorten, resp. deren wässrige Aufgüsse erzeugten in Glycerin stets nur Aethylalkohol, nie Butylalkohol. Zuletzt kam ich in den Besitz einer kleinen Quantität Heu aus dem Elsass. Auffallender Weise lieferte dieses das gewünschte Resultat. Anfangs entstand in Glycerin nur sehr wenig, aber deutlich bestimmbarer Butylalkohol neben viel Aethylalkohol, letzterer durch die stark vorwiegenden eigentlichen Heubacillen erzeugt.

Auch Plattenkulturen führten nicht direct zur Reingewinnung der Butylbacillen, und erst ein kleiner Kunstgriff machte ihre Isolirung möglich. Eine 5-procentige Glycerinlösung (es sind hier stets solche Lösungen mit den nöthigen Nährsalzen versehen und sterilisirt gemeint) wurde in einer starkwandigen Medicinflasche mit einigen Cubikcentimetern des kalten Heuinfuses versetzt, und die Flasche nach Aufsetzen von Gummistopfen und Glashahn evacuirt. Nach Stehenlassen während 3 Tagen bei 40° ergab die mikroskopische Untersuchung schon ein Zurücktreten des Bacillus subtilis, während andere Formen hervortraten. Von dieser Flüssigkeit wurde eine zweite Impfung in neues Glycerin vorgenommen und abermals unter Luftabschluss 3 Tage stehen gelassen.

Hiernach wurden Plattenculturen angelegt, und schon nach einigen Tagen erschienen neben den bekannten verflüssigenden Colonien des Heubacillus unregelmässig umschriebene, bei reflectirtem Licht stark irisirende, weissliche Colonien auf der Gelatine, welche nicht verflüssigt wurde.

Bei diesem Gange der Untersuchung liess ich mich von dem Gedanken leiten, dass der bacillus subtilis ein ausgesprochener Aërobier ist, der bei Luftabschluss wohl Gährung verursacht, sich aber nicht vermehrt, dass der Butylbacillus aber nach Allem, was über ihn bekannt ist, ein facultativer Anaërobier ist. Er wird daher bei Luftabschluss sich vermehren und allmählich seinen Concurrenten verdrängen. Der Erfolg hat diese Annahme gerechtfertigt.

Der nun in Reinkultur vorliegende Bacillus zeigte zunächst das mikroskopische Bild des von Fitz beschriebenen. Da letzteres jedoch sehr unvollständig ist, so möge hier noch Einiges ergänzend hinzugefügt werden. Die Bacillen sind sehr lang gestreckte elliptische Stäbchen, welche bei Beobachtung im hängenden Tropfen sehr lebhaft Bewegung zeigen. Dieselbe ist weniger eine schnelle Ortsveränderung, als eine drehende und tanzende wie bei einem Kreisel, der sich lebhaft dreht und dessen Axe dabei hin- und herschwankt. Am Ende der Zelle sitzt meist eine glänzende Spore, welche bisweilen stark anschwillt. Auf Kartoffeln, wo der Bacillus eine weisse körnige Masse bildet, finden sich nach einigen Wochen fast nur noch Sporen in bedeutender Grösse vor. Die Gelatine-Stichkultur zeigt auf dem ganzen Stichkanal Wachstum. Vorzüglich ist dasselbe auf Traubenzuckeragar bei 40°.

Eine Einsaat der reinen Bacillen in Glycerin bewirkte bei 40° schnell butylalkoholische Gährung, wenn auch die von Fitz angegebene Ausbeute nicht erreicht wurde. Aus 100 g Glycerin wurden in maximo 6.3 g reiner normaler Butylalkohol gewonnen, dessen Charakterisirung durch Siedepunkt und Analyse des Jodürs vorgenommen wurde. Fitz giebt 8.1 pCt. an. Auch in Mannit bewirkte der Mikrobe Gährung und lieferte aus 100 g Mannit 10.5 g Butylalkohol (Fitz 10, 2). Versuche im Grossen sind noch im Gange. In Traubenzucker wurde lediglich Aethylalkohol erzeugt, was mit den Fitz'schen Angaben ebenfalls übereinstimmt. In allen Fällen entstand gleichzeitig reichlich Buttersäure.

Es war nun von Interesse, die von Beyerinck <sup>1)</sup> ausgesprochene Ansicht, der Bac. butylicus von Fitz sei identisch mit seinem Granulobacter saccharobutyricum, den er aus Getreide erhalten, auch nach der chemischen Seite auf ihre Richtigkeit zu prüfen.

<sup>1)</sup> C. B. Bact. 15, 171.

Hr. Beyerinck hatte die Freundlichkeit, mir eine Reinkultur, zwar nicht des eigentlichen *G. saccharobutyricum*, aber eines diesem sehr nahe stehenden Bacillen, zur Verfügung zu stellen. Mikroskopisch zeigte er wenig Unterschied von dem *butylicus*, ausser dass hier die Spindelformen weit öfter auftraten, als bei dem Fitz'schen Mikroben. Entscheidend musste die Glyceringährung sein.

Mehrere nach dieser Richtung angestellte Versuche ergaben, dass der Beyerinck'sche Bacillus nur Aethylalkohol, aber keine Spur Butylalkohol erzeugte. Dagegen setzt der Fitz'sche Traubenzucker nicht in butylalkoholische Gährung, während dieses von dem *Granulobacter* angegeben wird. Die beiden Mikroben können also nicht identisch sein. Ebenso wenig aber kann eine Uebereinstimmung mit dem von Beyerinck beschriebenen *Granulobacter butylicum* möglich sein, weil letzterer aus Stärke Butylalkohol fabricirt, während der *bacillus butylicus* Stärke überhaupt nicht angreift. (Fitz, B. 1882 I. 880.)

Bei der Destillation des vergohrenen Traubenzuckers gehen mit den Aethylalkohol- und Wasser-Dämpfen fettartige Partikel über, welche als Flocken im Destillate, oder als dünne Decke darauf schwimmen. Obschon die Menge sehr gering ist, so gelang es doch, sie auf einem Filter zu sammeln und aus Alkohol umzukrystallisiren. Die Substanz bildet dann fettglänzende krystallinische Ueberzüge auf den Glasgefässen.

Zur Analyse reichte die Menge nicht aus, doch konnte der Schmelzpunkt zu  $60^{\circ}$  bestimmt werden. Es ist höchst wahrscheinlich, dass von dem Bacillus aus Traubenzucker etwas Palmitinsäure erzeugt wird, welche mit Wasserdämpfen sich verflüchtigt.

Durch Zufall begegnete ich dem *bacillus butylicus* noch in einem anderen Material. Mit der mikroskopischen Untersuchung von morschem Holz beschäftigt in der Hoffnung, aus diesem Cellulose vergärende Organismen zu gewinnen, fiel mir die Aehnlichkeit einzelner Bacterien mit dem *butylicus* auf. Sie kommen neben dem *bac. subtilis* ziemlich häufig vor. Die Kultur hat in der That die Identität mit dem *butylicus* ergeben, wie besonders auch die Glyceringährung evident erwiesen hat. Es genügte schon, etwas zerriebenes Holz einzusäen, um Glycerin in Gährung zu versetzen; unter den Producten fand sich auch normaler Butylalkohol, allerdings in geringer Menge.

Zu den Cellulose spaltenden Organismen scheinen diese Bacillen freilich nicht zu gehören, wenigstens haben die dahin zielenden Versuche bislang nur negative Resultate ergeben.