

## IV.

## Ueber die Produkte der bakterischen Zersetzung der Milch.

(Aus dem chemischen Laboratorium des Pathologischen Instituts zu Berlin.)

Von Dr. med. Ferdinand Blumenthal,  
Assistenten der I. med. Klinik des Herrn Geheimrath v. Leyden.

Quantitative chemische Untersuchungen über den Stoffwechsel der Bakterien sind bisher in verhältnissmässig geringem Maasse ausgeführt worden, wohl deshalb, weil dieselben einerseits nach den bisherigen Ergebnissen wenig Aussicht auf Bedeutung für die praktische Medicin darbieten, andererseits die geringe Ausbeute der einzelnen Stoffwechselprodukte technische Schwierigkeiten zeigt. Dazu kommt, dass die bisher nachgewiesenen Körper nur selten durch Reactionen identificirt werden können, es müssen entweder die Körper selbst rein dargestellt oder charakteristische Verbindungen hergestellt werden, die auch nur dann, wenn sie sich in gewisser Reinheit erhalten lassen, einen sicheren diagnostischen Maassstab abgeben können. Dennoch sind diese Untersuchungen für die Biologie der Bakterien höchst interessant und, wie ich glaube, für dieselbe von der höchsten Bedeutung. Wenn wir aus den Untersuchungen St. Rontaler's<sup>1)</sup> sehen, dass der Cholera bacillus Massaua, Essigsäure und optisch inactive Milchsäure, der Vibrio Metschnikoff Buttersäure und keine Milchsäure, der Commabacillus Koch nur Spuren von Fettsäuren und optisch inactiver Milchsäure producirt, so müssen wir bei der hervorragenden Aehnlichkeit dieser Bakterien in morphologischer Hinsicht, ja selbst bei ihrem Verhalten im Thierkörper chemisch constatiren, dass diese Arten in ihrem Stoffwechsel sehr divergiren, da sie den gleichen Nährboden, nemlich Traubenzuckerpepton in sehr verschiedener

<sup>1)</sup> St. Rontaler, Inaug.-Diss. St. Petersburg 1893. Aus Nencki's Laboratorium.

Weise zersetzen. Es ist damit chemisch ein wichtiger Beweis geführt für die Specificität der Bakterienarten. Wenn andererseits Grimbert<sup>1)</sup> fand, dass der *Pneumobacillus* Friedländer 2 isomere Zuckerarten, wie die Arabinose und die Xylose ganz verschieden spaltet, so zwar, dass das eine Mal Bernsteinsäure, das andere Mal links drehende Milchsäure entsteht, so ergeben sich aus diesen Spaltungen sehr wichtige Schlüsse für die Chemie in Bezug auf die Anordnung der Atomgruppen in diesen Körpern. Ebenso haben wir aus der Eiweisszersetzung wichtige Beiträge erhalten für die Kenntniss der einzelnen in den Eiweisskörpern enthaltenen Atomgruppen. Diese Kenntniss verdanken wir besonders den Arbeiten von Nencki, Baumann, E. und H. Salkowski, Brieger, Rubner und ihren Schülern. Neuerdings hat die Nencki'sche Schule aus dem Stoffwechsel der Bakterien eine Differentialdiagnostik für die einzelnen Arten zu schaffen gesucht. Die praktische Verwerthung dieser Befunde scheitert aber vorläufig daran, dass einerseits bei verschiedener Virulenz die einzelnen Arten in der quantitativen Bildung der einzelnen Stoffwechselprodukte sich verschieden verhalten mögen, ein Verhalten, welches durch die wenigen hierbei gemachten Untersuchungen noch gar nicht erforscht ist; andererseits vermögen wir meist aus dem morphologischen Verhalten und aus der Art des Wachstums diese Arten genügend zu differenzieren, so dass man nur in sehr zweifelhaften Fällen zu der zeitraubenden und unbequemen chemischen Untersuchung schreiten wird. Immerhin bilden die Untersuchungen der oben genannten Autoren den Grundstock unserer Kenntnisse des Stoffwechsels der Bakterien auf eiweisshaltigem Nährboden. Die Nencki'sche Schule hat sich besonders zu ihren Untersuchungen des Traubenzuckerpeptons bedient. Auffallender Weise liegen nur wenige genauere Untersuchungen über die Zersetzung der Milch vor, obwohl die Milch ein vorzüglicher Nährboden für die Bakterien ist, welcher Eiweisskörper, Kohlehydrate und anorganische Salze in wirksamer Concentration präformirt enthält; ausserdem wissen wir, dass gerade durch das Hineingerathen von pathogenen Keimen in die Milch Krankheiten übertragen werden können. Es erschien deshalb besonders interessant, gerade dem

<sup>1)</sup> Grimbert, Compt. rend. de la soc. de biol. 1896. No. 6.

Stoffwechsel der Bakterien in der Milch einige Aufmerksamkeit zu schenken, zumal ja auch die Art der Milchgerinnung, wie wir aus dem verschiedenen Verhalten des *Bacterium coli* und des *Typhusbacillus* wissen, zu diagnostischen Zwecken verwendet wird.

Soweit bis jetzt die Zersetzungen der Milch studirt worden sind, muss der Milchsäuregährung der erste Platz eingeräumt werden. Diese wird hervorgerufen durch den Hüppe'schen Milchsäurebacillus und zahlreiche mit ihm verwandte Arten, wie Hüppe und Andere nachgewiesen haben. Ausserdem wird allgemein angenommen, dass die spontane Säuerung der Milch, d. h. ihre Zersetzung durch die gewöhnlichen, in der Luft enthaltenen Mikroben durch die Entstehung der Milchsäure bedingt sei. Erst nach längerer Zeit trete Buttersäuregährung auf, indem die Milchsäure verschwindet und Buttersäure an ihre Stelle tritt. Als Milchsäurebildner werden ausserdem angesehen, vornehmlich der *Cholera* bacillus, das *Bacterium coli* und der *Typhus* bacillus von den pathogenen Arten. Neben der Milchsäuregährung wurde noch von Pasteur die Buttersäuregährung durch den *Bacillus butyricus*, von anderen Autoren, zuerst von Baginsky<sup>1)</sup>, eine Essigsäuregährung und eine schleimige Zersetzung<sup>2)</sup> der Milch unter Bildung von Schleimsäure beobachtet. Vor kurzer Zeit habe ich dann gelegentlich anderer Untersuchungen<sup>3)</sup> mitgetheilt, dass sowohl in Milch, welche der spontanen Zersetzung überlassen war, sich Bernsteinsäure gebildet hatte und zwar aus 500 ccm Milch 0,378 g. Aus dieser Milch konnte ich dann einen stäbchenförmigen Mikroben züchten, der neben Spuren von Milchsäure Bernsteinsäure producirt und zwar aus 500 ccm Milch 0,138 g vom Schmelzpunkt 181° nach 10tägiger Einwirkung auf dieselbe. Wie mir Professor E. Salkowski seiner Zeit mittheilte, hat er gleichfalls aus Milch, die er mit einem angeblichen Milchsäurebacillus geimpft hatte, statt der erwarteten Milchsäure Bernsteinsäure erhalten und zwar diese in so grossen Mengen, dass sie beim Abdestilliren des Aethers in dem Kolben selbst sofort auskrystallisirte.

Diesen Befund habe ich zugleich mit der Thatsache mit-

<sup>1)</sup> Baginsky, Zeitschr. für physiol. Chemie. Bd. XII. S. 434.

<sup>2)</sup> Schmidt-Müllheim; Hüppe, Deutsche med. Wochenschr. 1884. S. 777.

<sup>3)</sup> Dieses Archiv. Bd. 137. Heft 3. 1894.

getheilt, dass das *Bacterium coli* aus Milch Bernsteinsäure lieferte und zwar zwischen 0,38 und 0,57 g aus 500 ccm Milch<sup>1)</sup>. Die Menge war abhängig vom Alkalesenzgrade der Milch, indem schwach alkalisirte Milch die grösste Ausbeute lieferte. Durch diese Befunde erscheint es hinreichend erwiesen, dass es auch eine Bernsteinsäuregährung in der Milch giebt; damit war aber zugleich ein Widerspruch mit früheren Autoren gegeben, welche in eben diesen Fällen stets Milchsäuregährung registrirten, mit welcher Berechtigung, wird nachher erörtert werden. Es handelt sich bei folgenden Untersuchungen darum, diesen Widerspruch aufzuklären. Die Versuchsanordnung wurde deshalb zuerst auf die spontane Zersetzung beschränkt und so variiert, dass neutrale Milch, Milch mit Zusatz von kohlen saurem Natron, solche mit kohlen saurem Kalk, sowohl bei Zimmertemperatur als auch bei Bruttemperatur (39°) kürzere Zeit (4 Tage) und längere Zeit (3 bis 4 Wochen) sich selbst überlassen wurde. Die Gefässe, welche die Milch enthielten, waren möglichst breit, Spei- und Uringläser, um der Luft möglichst Zutritt zu verschaffen. Die Verarbeitung der Milch geschah im Grossen und Ganzen folgendermaassen:

Die hier angewandte Methode, deren einzelne Theile wohl bekannt sind, wurde in ihren Einzelheiten schliesslich, wie folgt, als Ergebniss der zahlreichen Versuche angewandt. Die zersetzte Milch wurde durch Leinewand von dem unzersetzten Casein abfiltrirt<sup>2)</sup>, das Filtrat wurde auf seine Reaction geprüft und event. durch Zusatz von Natriumcarbonat schwach alkalisirt. Das alkalische Filtrat wurde destillirt, bis das Destillat keine Jodoformreaction mehr gab. Um dieses zu erreichen, musste das Filtrat, nachdem bis auf ein Minimum abdestillirt war, nochmals mit Wasser auf sein ursprüngliches Volumen gebracht und von Neuem destillirt worden. Das Destillat wurde zur Prüfung auf Alkohol, Aldehyd, Indol, und Phenol verwandt. Der Rückstand wurde bis zur stark sauren Reaction mit verdünnter Schwefelsäure versetzt und destillirt, bis das übergeliebende Destillat mit Lacmuspapier keine rothe Färbung mehr zeigte<sup>3)</sup>.

<sup>1)</sup> Zeitschr. für klin. Medicin. Bd. 28. Heft 3 und 4.

<sup>2)</sup> Von dem Filtrat wurde eine Probe abgenommen, durch Erhitzen und Säurezusatz von Eiweiss befreit und an dem Filtrat die Biuretreaction angestellt, um zu sehen, ob eine Peptonisirung der Eiweisskörper eintritt. Sie war stets negativ. Eine Peptonisirung der Eiweisskörper fand also in der Milch durch die Zersetzung nicht statt.

<sup>3)</sup> Hammarsten empfiehlt bei der Darstellung der Fleischmilchsäure

Das Destillat wurde verwandt zur Prüfung auf die Menge der flüchtigen Säuren, indem dieselben mit Halbnormallauge titirt wurden. Zum qualitativen Nachweis der einzelnen flüchtigen Säuren wurde nach Hoppe-Seyler, Handbuch der physiologischen Chemie, verfahren.

Der im Destillirkolben bleibende Rückstand wurde im Schütteltrichter mit dem gleichen Volumen Aether versetzt und durchgeschüttelt, der Aether abgehoben und abdestillirt. Der ätherische Rückstand wurde eingedampft. Dieses wurde 3mal wiederholt. In gleicher Weise wurde der Rückstand in einzelnen Fällen noch mit einem Gemisch von Aether und Alkohol (10:1) wiederholt ausgeschüttelt, denn es zeigte sich häufig, dass die mit Aether allein extrahirten Auszüge zwar reiner waren, aber nur einen geringeren Theil der nicht flüchtigen Säuren enthielten, welche leichter in den alkoholhaltigen Aether übergingen. In fast allen Fällen waren aber die so gewonnenen nicht flüchtigen Säuren noch höchst unrein, zu ihrer Reinigung wurden die Rückstände in Wasser gelöst, filtrirt, die Filtrate eingedampft und wieder in Wasser gelöst. Hierbei zeigte sich, dass die zum zweiten und dritten Mal mit Wasser behandelten Rückstände Schmierien ausfallen liessen, die das erste Mal noch in die wässrige Lösung übergegangen waren. Die wässrige Lösung wurde nun filtrirt und wieder zur Trockne eingedampft, der Rückstand mit einem Gemisch von absolutem Alkohol und Aether durchgerührt, die Lösung abfiltrirt und wieder zur Trockne verdampft. Der noch immer stark gefärbte Rückstand wurde in Wasser gelöst und mit Knochenkohle gekocht, von der Kohle abfiltrirt und eingedampft. Nunmehr wurde ein nur noch schwach gefärbter Rückstand erhalten, der nur Milchsäure, Bernsteinsäure, Phenyllessig- und Phenylpropionsäure und die sogenannten Oxsäuren enthalten konnte. Es ist dies natürlich der umständlichste Weg, wie man zu einer Reinigung der Substanzen gelangen kann; man wird von Fall zu Fall urtheilen müssen, in welcher Weise man die Rückstände behandeln will.

Gab der Rückstand die Uffelmann'sche Probe, und zeigte er eine syrupartige Beschaffenheit, so wurde er mit Zinkoxyd gekocht und das Zinksalz mikroskopisch und chemisch zu identificiren gesucht, nachdem vorher eine Probe abgenommen war und mit der Hustenreaction und der Probe mit neutralem Bleiacetat auf Bernsteinsäure geprüft war. Waren Milchsäure und Bernsteinsäure neben einander enthalten, so wurde ihre wässrige Lösung mit Bleioxydhydrat gekocht und die erhaltene Lösung der Bleisalze zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde in kaltem Wasser gelöst, die

sich der Phosphorsäure zum Ansäuern vor dem Ausschütteln mit Aether zu bedienen. Bei unseren Versuchen bot die Phosphorsäure keine Vortheile vor der Schwefelsäure. Es zeigte sich vielmehr bei Anwendung der Phosphorsäure, dass die Gährungsmilchsäure schwerer in den Aether übertritt, als bei der Schwefelsäure. Eine Zerstörung von Milchsäure durch Kochen derselben mit verdünnter Schwefelsäure, findet, wie ich mich überzeugte, nicht statt.

wässrige Lösung abfiltrirt, mit Schwefelwasserstoff behandelt, von Schwefelblei abfiltrirt und eingedampft. Wurde nur ein Syrup erhalten, so wurde derselbe auf Milchsäure geprüft. Der in Wasser unlösliche Antheil der Bleisalze wurde in Eisessig gelöst, gleichfalls mit Schwefelwasserstoff entbleit, filtrirt und eingedampft. Diese Methode ist aber nur anzurathen, wenn grössere Mengen Bernsteinsäure vorhanden sind, da bei kleineren zu grosse Verluste stattfinden. Sind Phenylessigsäure und Phenylpropionsäure vorhanden, so gelingt es nur durch wiederholtes Verdampfen der wässrigen Lösung dieselben los zu werden. Die Prüfung auf Skatolcarbonsäure wurde mit Eisenchlorid oder mit Nitroprussidnatrium in der von Salkowski<sup>1)</sup> angegebenen Weise vorgenommen.

Leider muss an diesem Verfahren zugegeben werden, dass Spuren von Milchsäure, wie ich mich durch einen Controlversuch überführte, verloren gehen können, da dieselbe namentlich an der Luft, entgegen den bisherigen Beobachtungen mit Wasserdämpfen etwas flüchtig ist.

Der Alkohol wurde als Jodoform nachgewiesen, Aldehyd mit der Chautard'schen und Legal'schen Probe, das Phenol mit Salzsäure und Bromwasser, und auf Indol wurde mit Kaliumnitrit und concentrirter Schwefelsäure geprüft. Hierbei zeigte es sich, dass man mit dem Zusatz von Kaliumnitrit nicht vorsichtig genug sein kann. Mitunter gelingt, wie ich mich überzeugt habe, die Cholerareaction nur, wenn man die 0,02 procentige Lösung von Kaliumnitrit, wie sie E. Salkowski für diese Reaction vorschreibt, noch um das Zehnfache verdünnt. Niemals versagte die von mir angegebene Reaction mit etwa 2 ccm verdünnter Natronlauge und eben so viel verdünnter Salzsäure, welche vielleicht darauf beruht, dass die in den Handel kommende Natronlauge Spuren von Nitrit enthält gerade geeignet, um bei Anwesenheit geringer Mengen Indol die Cholerarothreaction hervor zu bringen. Dabei ist allerdings zu bemerken, wie ich schon früher ausgeführt habe, dass die benutzte Natronlauge sich bei der Prüfung mit Phenylendiamin und concentrirter Schwefelsäure als nitritfrei erwies. Aber möglicherweise ist diese Farbstoffbildung ein feineres Reagens auf Nitrit als das Phenylendiamin<sup>2)</sup>.

War Indol und Skatol in grösserer Menge vorhanden, so wurde die betreffende indolhaltige Lösung mit Wasser ausgeschüttelt und der Aether zur Trennung vom Phenol wiederum mit Natronlauge durchgeschüttelt. Wo Schwefelwasserstoff und Mercaptan vermuthet wurden, wurde der Zersetzungskolben mit der Wasserstrahlpumpe und einer 3procentigen Cyanquecksilberlösung in Verbindung gebracht. Ammoniak wurde durch das Verhalten seiner Dämpfe nachgewiesen. Zur quantitativen Bestimmung des letzteren kann man eine abgemessene Menge der zersetzten Milch dem Schlösing'schen Verfahren unterwerfen. Auf Oxy Säuren wurde der ätherische Rückstand mit Millon's Reagens geprüft.

<sup>1)</sup> E. Salkowski, Zeitschr. für physiol. Chemie. Bd. IX. Heft 1.

<sup>2)</sup> Zeitschr. für klinische Medicin. Bd. 28. Heft 3 und 4.

## Versuche.

### A. Spontane Zersetzung.

1. 300 Milch, Dauer der Zersetzung 20 Tage. Zimmertemperatur. Spur von Bernsteinsäure (Hustenprobe, Reaction mit neutralem Bleiacetat), Alkohol, keine Milchsäure, kein Indol und Phenol; kein  $H_2S$ , kein Methylmercaptan.

2. 300 Milch, Zusatz von 10 ccm 16procentiger  $Na_2CO_3$ , Dauer der Zersetzung 21 Tage. Zimmertemperatur. Spur von Bernsteinsäure, Alkohol, Uffelmann negativ (keine Milchsäure), kein Indol und Phenol, kein  $H_2S$ , kein Mercaptan.

3. 300 Milch Zusatz 10 g  $CaCO_3$ , Dauer der Zersetzung 22 Tage. Zimmertemperatur. Einige Centigramm Bernsteinsäure (Hustenprobe und Reaction mit neutralem Bleiacetat), Alkohol, Uffelmann schwach positiv, dagegen kein milchsaures Zink erhältlich. Kein Indol, kein Phenol; kein  $H_2S$ , kein Mercaptan.

4. 280 ccm Milch neutraler Reaction bei  $39^{\circ}$ — $41^{\circ}$  im Wärmeschrank 8 Tage lang sich selbst überlassen, Spuren Bernsteinsäure, Alkohol, Milchsäure nicht nachweisbar, kein Phenol, kein Indol, kein  $H_2S$ , kein Mercaptan.

5. 500 ccm Milch neutraler Reaction bei  $39^{\circ}$ — $41^{\circ}$  nach 48 Stunden verarbeitet. Alkohol. Weder Bernsteinsäure, noch Milchsäure, noch  $H_2S$ , Indol, Phenol, noch Mercaptan nachweisbar.

6. 500 ccm Milch mit 10 g  $CaCO_3$  versetzt, bei  $26^{\circ}$  96 Stunden stehen gelassen, Alkohol, Spuren von Bernsteinsäure (Probe mit neutralem Bleiacetat), keine Milchsäure nachweisbar, kein  $H_2S$ , kein Mercaptan, kein Indol, kein Phenol.

7. 300 ccm Milch mit 15 ccm 16procentiger  $Na_2CO_3$ -Lösung bei  $26^{\circ}$  120 Stunden stehen gelassen. Alkohol, Spuren von Bernsteinsäure (Hustenprobe, neutrales Bleiacetat), keine Milchsäure, kein  $H_2S$ , kein Mercaptan, kein Indol, kein Phenol.

8. 500 ccm Milch neutraler Reaction 30 Tage stehen gelassen bei Zimmertemperatur. Alkohol, 0,128 g Bernsteinsäure,  $176^{\circ}$  Schmelzpunkt, Uffelmann schmutziggelb, kein milchsaures Zinkoxyd erhältlich, Spuren von Oxyssäuren (Millon'sche Probe positiv), minimale Spur von Mercaptan, kein  $H_2S$ , kein Indol, kein Phenol.

9. 500 ccm Milch ebenso mit 10 ccm 16procentiger  $Na_2CO_3$ -Lösung. Spuren von Bernsteinsäure (neutrales Bleiacetat, Hustenprobe), Uffelmann schmutziggelb. Kein milchsaures Zinkoxyd erhältlich. Spuren von Oxyssäuren. Kein Mercaptan, kein Indol, kein Phenol, kein  $H_2S$  erhältlich.

10. Etwa 500 ccm neutral,  $\frac{1}{2}$  Monate Zimmertemperatur 0,378 g Bernsteinsäure, keine Milchsäure.

11. 500 ccm Milch 3 g  $CaCO_3$  18 Tage bei  $26^{\circ}$  stehen gelassen, keine Bernsteinsäure; geringe Mengen von milchsaurem Zinkoxyd (optisch inactiv).

12. 500 ccm 10procentiger  $Na_2CO_3$ -Lösung 15 Tage bei  $26^{\circ}$  stehen gelassen. Spuren von Bernsteinsäure; einige Centigramm milchsaures Zinkoxyd (optisch inactiv).

## B. Versuche mit Reinculturen.

### I. *Bacterium coli*.

1. 500 ccm neutral, Dauer der Zersetzung 24 Tage. Temp. 39—41°. Kein Schwefelwasserstoff, kein Mercaptan, kein Indol, kein Phenol. Alkohol als Jodoform 0,0212 g. Keine Milchsäure. Bernsteinsäure 0,5296 g. Schmelzpunkt 179°.

2. 500 ccm mit 4 ccm 10procentiger  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung versetzt. Dauer der Zersetzung 24 Tage. Temp. 39—41°. Kein  $\text{H}_2\text{S}$ , kein Mercaptan, kein Indol, kein Phenol. Keine Milchsäure. Alkohol als Jodoform 0,0174 g, Bernsteinsäure 0,5740 g. Schmelzpunkt 174°.

3. 500 ccm Milch mit 6 ccm 10procentiger  $\text{CO}_3\text{Na}_2$ -Lösung versetzt. Dauer der Zersetzung 24 Tage. Temp. 39—41°. Kein  $\text{H}_2\text{S}$ , kein Mercaptan, kein Indol, kein Phenol. Alkohol als Jodoform 0,019 g. Keine Milchsäure. Bernsteinsäure 0,387 g. Schmelzpunkt 176°.

### II. Kurze Stäbchen bildender *Bacillus* aus Milch gezüchtet.

1. 500 ccm Milch neutral, Dauer der Zersetzung 10 Tage; Spuren von Milchsäure? (Uffelmann.) Bernsteinsäure 0,138 g. Schmelzpunkt 181°.

2. 500 ccm Milch neutral, Dauer der Zersetzung 3 Tage. Alkohol, Uffelmann positiv. Kein milchsaures Zinkoxyd erhältlich, Spuren von Bernsteinsäure erhältlich.

### III. *Oidium lactis*.

500 ccm Milch neutral, Dauer der Zersetzung 10 Tage, erhebliche Mengen eines syrupösen Rückstandes, der die Uffelmann'sche Reaction in charakteristischer Weise gab, Spuren von Bernsteinsäure.

### IV. *Typhusbacillus*.

1. 500 ccm Milch neutral etwa 1 Jahr sich selbst überlassen, 2 Monate bei einer Temp. von 39—41°, dann bei Zimmertemperatur. Kein Mercaptan, kein  $\text{H}_2\text{S}$ , kein Indol, kein Phenol. Uffelmann zweifelhaft, kein charakteristisches Zinkoxyd erhältlich. 0,5328 g Bernsteinsäure. Schmelzpunkt 176°.

2. 500 ccm ebenso, nur mit 4 ccm 10procentiger Lösung von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  versetzt. Kein Mercaptan, kein  $\text{H}_2\text{S}$ , kein Indol, kein Phenol. Uffelmann Entfärbung (gelb, kein charakteristisches Zinkoxyd erhältlich). 0,56 g Bernsteinsäure. Schmelzpunkt 178°.

3. 500 ccm Milch ebenso, nur mit 6 ccm 10procentiger Lösung von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  versetzt. Kein Mercaptan, kein  $\text{H}_2\text{S}$ , kein Indol, kein Phenol. Uffelmann negativ. Bernsteinsäure 0,457 g. Schmelzpunkt 177°.

### V. Diplokokken aus dem Herzblut eines Kaninchens gewonnen, welches mit dem Sputum eines Pneumonikers inficirt war.

1. 500 ccm Milch neutral, 21 Tage im Brutschrank stehen gelassen. Alkohol, flüchtige Säuren 6,3 ccm<sup>1)</sup>. Uffelmann negativ. Einige Centigramm Bernsteinsäure.

<sup>1)</sup> Auf Halbnormaloxalsäure berechnet.



2. 500 Milch, 8 ccm kohlensauen Natrons (16 pCt.), ebenso wie 1. Alkohol, flüchtige Säuren 9,0 ccm. Uffelmann negativ. 0,1014 g Bernsteinsäure vom Schmelzpunkt 178,5.

3. 500 ccm Milch, 10 ccm 16 pCt. kohlensauen Natrons, ebenso wie 1. Alkohol, flüchtige Säuren 16,5. Spur von Bernsteinsäure. Uffelmann negativ.

#### VI. Cholerabacillen<sup>1)</sup>.

2 Liter Milch wurden 28 Tage der Zersetzung im Brutschrank überlassen. Nach 24 Stunden ist die Milch in eine gelblich-grüne, seröse Flüssigkeit mit starker Gasentwicklung verwandelt; an der Oberfläche befindet sich eine dicke Fettkruste, am Boden ein geringer Niederschlag. Alkohol als Jodoform gewogen 0,1898 g, flüchtige Säuren 320 ccm auf Halbnormalsäure berechnet. Bernsteinsäure 0,4416, Schmelzpunkt 177°. 0,6526 g milchsaures Zinkoxyd, keine Drehung der Polarisationssebene.

#### VII. Milchsäurebacillus (Hüppe)<sup>1)</sup>.

2 Liter wie Choleramilch behandelt. Alkohol als Jodoform 0,044 g, flüchtige Säuren 85,5 ccm. Keine Bernsteinsäure. Milchsaures Zinkoxyd 1,208 g. Keine Drehung der Polarisationssebene. Die in der Milch gefundene Milchsäure war demnach stets Gährungsmilchsäure und optisch inactiv.

Auffallend ist, dass wir bei der mit den verschiedensten Bakterien vorgenommenen Zersetzung der Milch nur einmal ein stickstoff- und schwefelhaltiges Produkt wahrgenommen haben, nemlich geringe Spuren von Mercaptan, trotz der grossen Menge von Eiweisskörpern, welche die Milch enthält. Dies konnte nur daran liegen, dass entweder die Eiweisskörper der Milch, vornehmlich das Casein einer Zersetzung nicht fähig waren, oder dass andererseits die aus dem Milchzucker entstehenden Produkte eine Eiweisszersetzung verhindern. In der That waren Produkte gefunden worden, welche auch bei der Eiweisszersetzung entstehen können, nemlich Bernsteinsäure, welche nach den Untersuchungen von Salkowski<sup>2)</sup> Brieger<sup>3)</sup> und mir<sup>4)</sup> aus Eiweiss entstehen kann. Ob Milchsäure aus bakteriell zersetztem Eiweiss entstehen kann, darüber sind die Autoren nicht einig. Während die Nencki'sche Schule wiederholentlich bei der Zersetzung von Traubenzuckerpepton Milch-

<sup>1)</sup> Die Cultur verdanke ich der Liebenswürdigkeit des Privatdocenten Herrn Dr. Günther, dem ich hierfür meinen herzlichsten Dank abstatte.

<sup>2)</sup> E. und H. Salkowski, Ber. der chem. Gesellsch. Bd. XXI. S. 680.

<sup>3)</sup> Brieger, Zeitschr. für physiol. Chemie. Bd. V. S. 366—369.

<sup>4)</sup> Dieses Archiv. Bd. 137.

säure nachgewiesen hat (hier stammt wohl die Milchsäure aus dem Traubenzucker) und während Credé sogar auf dem letzten Chirurgencongress die antiseptische Wirkung metallischen Silbers auf inficirte Wunden der baktericiden Eigenschaft der durch die Bakterien an der inficirten Stelle gebildeten Milchsäure zuschreibt, die mit dem Silber sich verbinden soll, haben weder Salkowski, noch ich bei unseren Untersuchungen der Zersetzung des Muskelfleisches, des Fibrins und des Peptons Milchsäure erhalten, sondern stets Bernsteinsäure. Auch Seelig<sup>1)</sup>, der mit Milchzuckerpeptonlösung arbeitete, welche er mit *Bacterium coli* beschickte, fand nie Milchsäure, sondern Bernsteinsäure. Immerhin war es möglich, dass Casein sich anders verhielte, als die von uns untersuchten Eiweisskörper. Deshalb machte ich folgenden Versuch: Durch Fällung mittelst Essigsäure wurde aus einem halben Liter Milch etwa 20 g Casein gewonnen. Dasselbe wurde ausgewaschen, bis das Waschwasser fast neutrale Reaction zeigte, dann wurde mit einer Lösung von kohlensaurem Natron 5:500 das Casein gelöst und bei 26° sich selbst überlassen. Bekanntlich fault Casein sehr schwer und es gelang in zwei Versuchen mit käuflichem Casein nicht dasselbe in Fäulniss zu versetzen. Ich verfuhr nach der von mir früher beschriebenen Methode<sup>2)</sup> und fand 0,196 g Bernsteinsäure vom Schmelzpunkt 179,5°, dagegen keine Milchsäure.

Damit ist es ausgeschlossen, dass sich die Milchsäure in der Milch aus dem Casein bilden kann. Dieser Befund bei der Caseinfäulniss ist wieder eine Bestätigung der von Salkowski<sup>3)</sup> vertretenen Ansicht, dass nur vom lebenden Eiweiss Milchsäure gebildet wird, nicht aber in einem abgestorbenen Gewebe und auch nicht bei der bakteritischen Zersetzung der Eiweisskörper. Ich glaube durch zahlreiche Untersuchungen diese Ansicht bestätigt zu haben und möchte durch diese Untersuchungen zu dem Schluss kommen, dass überall da, wo bei der Eiweisszersetzung

<sup>1)</sup> Seelig, Dieses Archiv. Bd. 146. Heft 1.

<sup>2)</sup> Dieses Archiv. Bd. 137. Hft. 3. S. 551.

<sup>3)</sup> Salkowski, Autodigestion der Organe. Jubelband für Leyden's Jubiläum. Zeitschr. für klin. Med.

von Milchsäure die Rede ist, dafür Bernsteinsäure zu setzen ist. Es ist demnach wiederholentlich ausser den flüchtigen Fettsäuren nur ein einziges Produkt gefunden worden, nemlich die Bernsteinsäure, welche auch bei der Zersetzung der Eiweisskörper gebildet wird. Wenn dieselbe aber aus dem Eiweiss der Milch stammen sollte, so war es auffallend, dass nicht noch andere bei der Eiweisszersetzung entstehende Produkte gefunden wurden ausser der Bernsteinsäure. Oder sollte das Casein sich anders bei der bakteritischen Spaltung verhalten, als die übrigen Eiweisskörper. Dass dies nicht der Fall ist, beweist folgender Versuch, wo 25 g Casein in einer Lösung von 500 ccm  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , welche 5 g reines Soda enthielt, einer 10tägigen Fäulniss überlassen war. Bei diesem Versuch, der nach der früher beschriebenen Methode<sup>1)</sup> verarbeitet wurde, wurden erhalten geringe Mengen von Mercaptan, reichlich Phenol, Indol und namentlich Skatol. Auch Salkowski<sup>2)</sup> hat früher bei der Caseinzersetzung reichlich Phenol und Indol gefunden.

Wenn ich keinen  $\text{H}_2\text{S}$  gefunden habe so liegt das daran, dass die Alkalisierung eine sehr grosse war, denn es zeigte sich bei früheren Versuchen, dass die Bildung des Schwefelwasserstoffs vom Alkaligehalt der Mischung abhängig ist und dass gerade eine hohe Dosirung von Alkali die Bildung von  $\text{H}_2\text{S}$  völlig hindern kann.

Ausser den genannten Produkten wurden gefunden: Flüchtige Säuren: und zwar 85 ccm Halbnormallauge sättigend. Qualitativ wurde nachgewiesen Essigsäure und da 42,6 Theile Baryum in 100 Theilen des Barytsalzes enthalten waren, so wurde geschlossen, dass es sich um ein Gemisch von Buttersäure und Baldriansäure handelte. Von nicht flüchtigen Säuren wurden Skatolcarbonsäure, Phenyl-Essig-, Phenylpropionsäure und Bernsteinsäure nachgewiesen. Es war also damit sicher, dass in der Milch keine Caseinzersetzung stattgefunden hatte.

Dieses Verhalten der Zersetzung von reinem Casein macht es ganz unwahrscheinlich, dass in der Milch die Bernsteinsäure und die flüchtigen Fettsäuren aus dem Casein stammen können. Ehe wir aber weiter untersuchen, welches die Quelle für die Zersetzungsstoffe der Milch ist, wird es interessant sein, zu erfahren, warum es für gewöhnlich in der Milch zu keiner Ei-

<sup>1)</sup> Zeitschr. für klin. Med. 28.

<sup>2)</sup> E. Salkowski, Berl. klin. Wochenschr. 1894. No. 47.

weisszersetzung kommt und ob eine solche überhaupt in der Milch hervorgerufen werden kann.

Wie wir aus den Untersuchungen von Winternitz<sup>1)</sup>, und Strauss<sup>2)</sup> wissen, hemmen Traubenzucker und Milchzucker die Eiweisszersetzung. Systematische Untersuchungen über diesen Gegenstand sind aber erst in neuester Zeit von Seelig angestellt worden. Seelig zeigte für *Bacterium coli*, dass in Milchzucker enthaltenen Peptonlösungen keine Bildung der aus der Eiweisszersetzung stammenden Produkte stattfand.

Er erhielt nur die gleichfalls aus den Kohlehydraten stammende Bernsteinsäure, sowie flüchtige Fettsäuren. In der That tritt in der Milch eine Eiweisszersetzung erst auf, wenn der Milchzucker vollständig vergohren ist. Dass eine solche Eiweisszersetzung in der Milch thatsächlich stattfinden kann, beweist folgender Versuch. Die in der zersetzten Milch enthaltenen Säuren wurden von Zeit zu Zeit mit kohlensaurem Natron neutralisirt und die Milch dann weiter der spontanen Zersetzung überlassen, bis der gesammte Milchzucker, wie der negative Ausfall der Trommer'schen Probe bewies, vergohren war. Die Milch wurde nun noch 8 Tage sich selbst überlassen. Es entstanden nun sämmtliche bei der Caseinfäulniss auftretenden Produkte: Ammoniak, Mercaptan, Indol, Skatol, Phenol, Phenylessigsäure und Phenylpropionsäure. Ausserdem wurden Alkohol, flüchtige Fettsäuren und Bernsteinsäure erhalten. Die Bildung von Schwefelwasserstoff war nicht bemerkbar.

Damit ist bewiesen, dass zwar eine Eiweisszersetzung in der Milch möglich ist, dass dieselbe in der Regel aber nicht stattfindet, weil die Zersetzung der Milch sistirt, ehe es zur vollkommenen Vergährung des Milchzuckers kommt. Dieser Stillstand in der Milchzersetzung wird dadurch hervorgerufen, dass die entstehenden Säuren die Bakterien in ihrer Lebensthätigkeit hemmen. Werden aber die durch Zersetzung der Milch gebildeten Säuren immer

<sup>1)</sup> Winternitz, Zeitschr. für physiol. Chemie. Bd. 16.

<sup>2)</sup> Strauss, Berl. klin. Wochenschr. 1896. No. 18.

wieder neutralisirt, so treten, wenn der Milchzucker völlig vergohren ist, die Produkte der Eiweisszersetzung auf.

Was die einzelnen bei der Zersetzung der Milch gefundenen Produkte der Milch anbetrifft, so wurde der Alkohol als Jodoform bestimmt. Die den Alkohol enthaltenden Destillate gaben ausserdem noch die Probe mit Schwefelsäure und chromsaurem Kali, die Gunning-Reynault'sche Probe und die Tollen'sche Silberreaction. Bei den Untersuchungen mit *Bacterium coli*, ebenso wie bei der spontanen Zersetzung war einige Male die Chautard'sche Probe positiv. Dieselbe ist eine Reaction auf Aldehyd. Dagegen war die Legal'sche Probe, Nitroprussidnatrium und Natronlauge, welche nach E. Salkowski<sup>1)</sup> gleichfalls Aldehyd beweist, negativ. Der negative Ausfall derselben ist wohl dadurch bedingt, dass nur Spuren von Aldehyd vorhanden waren, welche durch diese Probe, die nicht sehr fein ist, nicht nachgewiesen werden können. Ausser dem Alkohol wurden flüchtige und nicht flüchtige Säuren gefunden.

Unter den nicht flüchtigen Säuren war fast nur Milchsäure und Bernsteinsäure vorhanden. Was die Identificirung der Milchsäure in der Milch, anbelangt, so ist bei der allgemein vertretenen Meinung, dass die gesammte in der Milch vorhandene Säuren auf Milchsäure zu beziehen sei, oft deren Menge durch die Titrirung des Milchserums bestimmt worden, während andere sich sogar von ihrem Vorhandensein überführt zu haben glaubten, wenn sie die Milch mit Lacmuspapier auf Säurebildung prüften. In einer derartigen Titration, wie sie z. B. Thörner<sup>2)</sup> vornahm, kann man aber nicht einen qualitativen Nachweis der Milchsäure erblicken.

Die in der Milch entstehenden Säuren gehören, wie wir gesehen haben, nicht blos den nicht flüchtigen Säuren an, wie Milchsäure und Bernsteinsäure, sondern es konnte in allen Fällen nachgewiesen werden, dass jedesmal neben den erwähnten nicht flüchtigen noch flüchtige Säuren entstanden, die den flüchtigen Fettsäuren zugerechnet werden müssen. Ja, es überstieg sogar einige Male die Menge der flüchtigen Säuren die der

<sup>1)</sup> E. Salkowski, Pflüger's Archiv. Bd. 56. 1894.

<sup>2)</sup> Thörner, Chem. Zeitung. 16. 1469.

nicht flüchtigen um ein Beträchtliches. Im Einzelnen waren die Mengenverhältnisse der flüchtigen Säuren und der nicht flüchtigen auf Halbnormalsäure berechnet, folgende:

	Ver- such	Menge der Milch	Menge der flüchtigen Säuren auf Halboxalsäure berechnet	Bernstein- säure g	Milchsäure als Zinkoxyd gewogen
Spontane Zersetzung	8	500	8,5	0,128	—
	10	500	10,5	0,378	—
Bacterium coli	2	500	20,8	0,574	—
	3	500	40,0	0,387	—
Typhusbacillus	1	500	23,5	0,5328	—
	2	500	25,0	0,560	—
	3	500	30,5	0,457	—
Cholera bacillus		2000	320,0	0,4416	0,6527
Milchsäure bacillus Hüppe		2000	85,5	—	1,208
Diplococcus	2	500	9,0	0,1014	—
	3	500	16,5	Spuren	—

Daraus geht zur Genüge hervor, dass man kein Recht hat, die Menge der durch Titration des Milchserums erhaltenen Säure auf eine einzelne qualitativ bestimmte Säure zu berechnen.

Welcher Art sind nun die flüchtigen Säuren? Es konnte niemals Ameisensäure, dagegen mehrere Male Essigsäure bei der spontanen Zersetzung nachgewiesen werden. Fast in allen Fällen war sofort darauf untersucht worden, ob Butter-, Valeriansäuren und Caprylsäure vorhanden waren. Meistens konnte man dieselben schon durch den Geruch der Destillate identificiren. Ausserdem schieden sich noch fettartige Massen in den Destillaten aus, welche den höheren Fettsäuren zugerechnet werden müssen. Diese Säuren sind sowohl bei der spontanen Gährung der Milch, als auch bei der mit Reinculturen gefunden worden.

Fast noch complicirter liegen die Verhältnisse beim Nachweis der nicht flüchtigen Säuren. Wenn ich oben ausgeführt habe, dass man nicht berechtigt ist aus der Säuerung der Milch allein auf Milchsäure zu schliessen, so fragt es sich, was wohl als Beweismittel für das Vorhandensein von Milchsäure gelten kann. Die Uffelmann'sche Reaction leidet an Unsicherheiten, so dass man nur so viel sagen kann, dass ein negativer Ausfall dieser Reaction sicher die Abwesenheit von Milchsäure,

ein positiver aber nicht die Anwesenheit derselben erweist. Etwas weniger empfindlich ist stark verdünntes Eisenchlorid. Ob man aber aus einer Grünfärbung desselben mit Sicherheit auf Milchsäure schliessen kann, steht noch dahin. Mit dem von Strauss<sup>1)</sup> angegebenen Apparat, welcher sich bei den Untersuchungen des Mageninhalts auf Milchsäure bewährt hat, wurden qualitativ brauchbare Resultate erzielt. Derselbe kam bei den Versuchen mit Cholera- und Milchsäurebacillen in Anwendung<sup>2)</sup>.

Sicherer ist es, das Zinksalz der Milchsäure darzustellen. Die kleinen, balkenförmigen Krystalle sind bis jetzt als ziemlich charakteristisch zu betrachten.

Absolut sicher ist die Bestimmung des Wassergehalts des Zinksalzes, welches rein aber nur bei wiederholtem Umkrystallisiren erhalten wurde, was jedesmal natürlich einen Verlust an Substanz bedingte. Auf diese Weise ist in der mit Cholera-bacillen und Milchsäurebacillen beschickten Milch mit Sicherheit Milchsäure nachgewiesen worden. Zweimal wurde bei der spontanen Zersetzung das charakteristische Zinksalz erhalten, 7mal war die Uffelmann'sche Probe sicher negativ, 3mal positiv, aber kein Zinksalz erhältlich. Eben so gelang es weder mit *Bacterium coli*, noch mit dem *Typhusbacillus* das Zinksalz der Milchsäure zu erhalten. Das gleiche war der Fall bei der Diplokokkenmilch.

Der Nachweis der Bernsteinsäure ist durch ihre Schmelzung auf dem Platinblech an der Entwicklung zum Husten reizender Dämpfe, durch die Probe mit neutralem Bleiacetat und durch den Schmelzpunkt von etwa 180° zu führen. Durch den Schmelzpunkt, sowie alle übrigen Reactionen war die Bernsteinsäure identificirt bei allen Versuchen mit *Bacterium coli*, dem Typhus-, dem Cholera-bacillus, ausserdem in einem Falle mit Diplokokken; 2mal bei der spontanen Zersetzung. Durch die Probe mit neutralem Blei, durch die Art der Krystallisation, durch Erhitzen auf dem Platinblech wurde Bernsteinsäure nachgewiesen bei der spontanen Zersetzung 5mal.

<sup>1)</sup> Strauss, Berl. klin. Wochenschr. 1895. 37.

<sup>2)</sup> Natürlich wurde der ätherische Rückstand mit ihm geprüft, nachdem derselbe in Wasser gelöst war.

Zweimal war der Nachweis zweifelhaft und 3mal konnte keine Bernsteinsäure gefunden werden. Darunter 1mal mit Sicherheit auch keine Milchsäure. In diesem Falle hatte die Zersetzung nur 2 Tage gedauert. (In in den beiden anderen Fällen wurde das charakteristische Zinksalz der Milchsäure erhalten.) Ebenso konnte keine Bernsteinsäure bei der Zersetzung des Hüppe'schen Milchsäurebacillus nachgewiesen werden, sondern nur Milchsäure. Unter 26 Versuchen wurde also mit den verschiedensten Bakterien nur 3mal Milchsäure allein nachgewiesen [Milchsäurebacillus (1), spontane Zersetzung (2)], 17mal wurde nur Bernsteinsäure gefunden [Diplococcus (3), Typhusbacillus (3), Bacterium coli (3), kurze Stäbchen aus Milch (1), spontane Zersetzung (7)]. Milchsäure und Bernsteinsäure neben einander wurden nachgewiesen 3mal [Cholerabacillus (1), Oidium lactis (1), kurze Stäbchen aus Milch (1)]. Hierbei ist zu bemerken, dass, wenn grosse Mengen Milchsäure neben geringeren von Bernsteinsäure vorhanden sind, die Krystallisation der Bernsteinsäure völlig ausbleiben kann.

Erst die Probe mit neutralem Blei und die Hustenreaction zeigt das Vorhandensein der letzteren an. Eine Trennung der Bernsteinsäure von der Milchsäure durch das Verfahren mit Bleioxydhydrat führt bei Anwesenheit so kleiner Mengen nicht zum Ziel. Wir kommen also zu folgendem Schluss: Von den zur Untersuchung gelangten Bakterienarten geht nur der Hüppe'sche Milchsäurebacillus eine reine Milchsäuregährung ein. Ebenso kann eine solche stattfinden bei der spontanen Zersetzung der Milch. Häufiger ist bei der spontanen Zersetzung die Bernsteinsäuregährung. Letztere ist eine sehr verbreitete in der Milch vorkommende Zersetzungsart. Die Bernsteinsäuregährung geht einher unter Bildung von Alkohol, Aldehyd, flüchtigen Säuren und der Bernsteinsäure. Dieselben entstehen vorzüglich aus dem Milchzucker. Dabei ist es qualitativ gleichgültig, ob neutrale oder alkalische Milch zur Zersetzung gelangt. Zusatz von kohlensaurem Kalk scheint für die Bildung von flüchtigen Säuren am günstigsten zu sein. Qualitativ verläuft die Gährung bei Zimmertemperatur eben so wie bei Bruttemperatur; bei letzterer schneller. Auch die Milchsäuregährung geht mit der Bil-



dung flüchtiger Säuren einher, diese können gleichfalls aus dem Milchzucker entstehen. In der neuesten Zeit hat Siegfried<sup>1)</sup> nachgewiesen, dass in der Milch und dem Muskelfleisch Phosphorfleischsäure vorkommt und dass man aus derselben sowohl Milchsäure als auch Bernsteinsäure abspalten kann. Es erschien deshalb interessant zu untersuchen, ob bei der Zersetzung der Milch auf Kosten der Phosphorfleischsäure Milchsäure und Bernsteinsäure gebildet werden. Um dieses zu prüfen, wurde folgender Versuch gemacht: Von 2 Litern Milch wurde einer sofort nach dem von Balke und Ide<sup>2)</sup> angegebenen Verfahren auf Phosphorfleischsäure verarbeitet, der andere 8 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen. In dem sofort verarbeiteten Liter Milch wurden 0,5021 g Phosphorfleischsäure<sup>3)</sup> gefunden. In dem der Zersetzung überlassenen Liter Milch nur 0,243 g. Also ist die Phosphorfleischsäure gleichfalls eine Quelle für die Zersetzungsprodukte der Milch<sup>4)</sup>. Da wir gesehen haben, dass die Produkte der Milch zum Theil aus dem Milchzucker, zum Theil aus der Phosphorfleischsäure entstehen, so forschte ich nach, ob Reinculturen der hier verwandten Materialien auf reinen Zuckerlösungen sich anders verhalten, als in der Milch.

Bei der Gährung des Manits fand Fitz<sup>5)</sup>, bei der des Amylums E. Salkowski, und ich<sup>6)</sup> bei der des Rohrzuckers mit Schizomyceten Bernsteinsäure. In dem letzten Falle wurde ausserdem Essigsäure, Butter- und Milchsäure gefunden. Tate<sup>7)</sup> züchtete aus Birnen Kokken und Stäbchen, die aus Traubenzucker, Alkohol, linksdrehende Milchsäure und Bernsteinsäure

<sup>1)</sup> Siegfried, Zeitschr. für physiol. Chemie. Bd. 21. S. 360. 1896.

<sup>2)</sup> Balke und Ide, Ebendasselbst. Bd. 21. S. 380. 1896.

<sup>3)</sup> nach Siegfried als Fleischsäure berechnet.

<sup>4)</sup> Die Arbeit von Lübbert (Zeitschr. für Hygien. Bd. 22. Heft 1), welche mir erst während der Drucklegung dieser Arbeit zu Gesicht kam, konnte leider nicht mehr berücksichtigt werden. Offenbar habe ich nirgends die anaeroben Flügge'schen peptonisirenden Milchbakterien vor mir gehabt.

<sup>5)</sup> Fitz, Bericht der Deutschen chem. Gesellsch. Bd. X. S. 281. Bd. XI. S. 42.

<sup>6)</sup> Dieses Archiv. Bd. 137. S. 564.

<sup>7)</sup> Tate, Journ. of the Chemie Soc. 1893. p. 1293.

bildeten, daneben Essigsäure und Ameisensäure. Bischler fand in Nencki's Laboratorium mit *Bact. coli*<sup>1)</sup> bei Traubenzucker- und Milchzuckergährung Alkohol, Essigsäure und rechtsdrehende Milchsäure. Grimbert erhielt bei Milchzuckergährung mit *Bact. coli*<sup>1)</sup> Bernsteinsäure und Essigsäure, bei Traubenzuckergährung linksdrehende Milchsäure.

Durch diese Literaturangabe ist festgestellt, dass die Bakterien in reinen Zuckerlösungen nicht nur die Milchsäuregährung, sondern auch die Bernsteinsäuregährung eingehen, also sich in reinen Zuckerlösungen ähnlich verhalten, wie in Milch.

Was nun das Verhalten ähnlicher Bakterienarten in Bezug auf ihre Zersetzung der Milch für diagnostische Zwecke anbelangt, so kann ich für *Typhusbacillen* und das *Bacterium coli* absolut keinen greifbaren Unterschied in der Zersetzung der Milch constatiren, falls man nicht auf die Aeusserlichkeit, dass *Typhusbacillen* Milch schwerer zur Gerinnung bringen, als das *Bacterium coli*, Werth legen will. Ich glaube also, dass man darauf wird verzichten müssen, für diese beiden Bakterienarten aus der chemischen Zersetzung der Milch etwas zu schliessen.

Soweit meine Untersuchungen über die Toxinbildung in der Milch einen gewissen Schluss gestatten, mögen sie hier mitgetheilt sein.

Da für gewöhnlich, wie aus obigen Untersuchungen hervorgeht, keine bakterielle Eiweisszersetzung in der Milch stattfindet, so konnte auch angenommen werden, dass keine Toxine in der Milch entstehen, da nach Brieger und Fraenkel<sup>2)</sup> die Toxine der Bakterien aus den Eiweisskörpern des Zersetzungsmaterials stammen sollen. Hatten sich auch hiergegen Ouschinsky<sup>3)</sup> und Guinichet<sup>4)</sup> ausgesprochen, da diese

<sup>1)</sup> Da zur *Coli*-Gruppe eine ganze Anzahl Bakterien gerechnet werden, so haben beide Autoren mit verschiedenen Varietäten dieser Art gearbeitet, woraus sich die verschiedenen Resultate erklären. A. Baginski und Péré fanden Milchsäure bei der Gährung des Milchzuckers mit *Bact. coli*.

<sup>2)</sup> Brieger und C. Fraenkel, Berl. klin. Wochenschr. 1891. No. 11 und 12.

<sup>3)</sup> Ouschinsky, Arch. de médecine expér. et d'anat. path. 1893, und Centralbl. für Bakter. 1893.

<sup>4)</sup> Guinichet, Arch. de méd. expér. 1892.

Autoren auf eiweissfreien Nährböden das spezifische Diphtheriegift erhalten hatten, so dass diese Autoren annehmen, dass das Gift in der Bakterienzelle gebildet und durch das Plasma derselben ausgeschieden wird, so konnten doch C. Fraenkel<sup>1)</sup>, Hugonency und Doyen<sup>2)</sup> diese Versuche nicht bestätigen, da ihre Culturen auf den eiweissfreien Medien der oben genannten Autoren nicht gediehen. Kossel<sup>3)</sup>, der Spuren von Diphtheriegift den Bakterienleibern anhaften fand, aber entschieden leugnet, dass das Giftigwerden der Culturen allein auf einem Auslaugeprozess der Bakterienleiber beruht, nimmt an, dass das Diphtheriegift aus dem dargebotenen Nährmaterial innerhalb der Bakterienzelle gebildet und alsbald secernirt wird, während er die Frage, aus welchen Stoffen die Bacillen die Toxine bilden, offen lässt.

Auf der anderen Seite hatte ein so hervorragender Forscher wie Buchner<sup>4)</sup> auf eiweissfreien Lösungen von Asparagin das spezifische Tetanusgift erhalten, so dass wir für dieses Gift wenigstens annehmen müssen, dass es nicht aus dem Eiweiss des Zersetzungsmaterials zu stammen braucht. Eine generelle Bedeutung für die anderen Bakterien konnte aber diese Thatsache nicht gewinnen.

Während also es als bewiesen gelten darf, dass die Bakteriengifte nicht einfache Auslaugungsprodukte aus den Leibern der Bakterien sind, sondern aus dem Zersetzungsmaterial stammen müssen, ist die Frage noch nicht allgemein entschieden, ob die Toxine aus den Eiweisskörpern des Nährmaterials abgespalten werden oder ob es sich bei der Toxinbildung um einen synthetischen Prozess in der Bakterienzelle aus stickstoffhaltigem Material handelt, das nicht den Eiweisskörpern angehört. Diese Frage konnte bei einem positiven Ausfall der Versuche bis zu einem gewissen Grade durch die Untersuchung der Milch auf Toxine gelöst werden.

Neutrale Milch wurde mit Culturen von Cholera, Diphtherie und Tetanusbacillen geimpft und 4 Wochen bei Bruttempe-

<sup>1)</sup> Hygienische Rundschau. 1894. No. 17.

<sup>2)</sup> La province médicale. No. 19. 1896.

<sup>3)</sup> H. Kossel, Centralbl. für Bakteriöl. 1896. No. 25.

<sup>4)</sup> Münchn. med. Wochenschr. 1893. No. 24—25.

ratur 39° stehen gelassen; dann wurden durch Chloroform die Bakterien abgetödtet und die Flüssigkeit nach Filtration durch Leinwand, durch Durchsaugen durch den Nordmeyer-Berkefeld-Apparat von den Bakterienleibern befreit. Die so erhaltene Flüssigkeit wurde, um sie steril zu erhalten, mit Chloroform versetzt und an Thieren auf ihre Toxicität geprüft. Es zeigte sich, dass diese so aus der Milch gewonnenen, schwach gelb gefärbten, klaren Lösungen, die stets steril waren, das specifische Toxin der oben genannten Bakterien enthielten. Doch war die Menge des erhaltenen Toxins in neutraler Milch im Vergleich zu derjenigen, welche man aus Peptonbouillon bekommt, eine sehr geringe. Dies konnte entweder daran liegen, dass der Milchzucker einen gewissen Schutz gegen die Toxinbildung abgibt, indem er dieselbe hemmt, aber nicht völlig aufhebt oder aber es konnte die neutrale Reaction der Milch daran Schuld sein, indem die Bakterien durch die bei der Milchezersetzung entstehenden freien Säuren in ihrer Lebensthätigkeit gehindert wurden. Der letzte Punkt konnte durch eine Wiederholung der Versuche mit alkalisirter Milch geprüft werden. Deshalb wurden 300 ccm Milch mit 5 ccm 16procentiger Lösung von kohlen saurem Natron alkalisirt und mit Cholera bacillen beschickt.

Während von der neutralen Milch, die 4 Wochen lang der Einwirkung der Cholera bacillen ausgesetzt war und die in der oben geschilderten Weise behandelt war, 8—10 ccm nöthig waren, um nach der Injection in die Bauchhöhle ein Meerschweinchen von 250 g unter klonischen Krämpfen in 6 bis 12 Stunden zu tödten, genügten von der Milch, die mit 5 ccm 16procentiger Lösung von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  versetzt war,  $2\frac{1}{2}$ —3 ccm, um ein gleich schweres Meerschweinchen zu tödten. Dabei war diese alkalisirte Milch nur 8 Tage der Einwirkung von Cholera bacillen ausgesetzt gewesen.

Daraus ergibt sich, dass hauptsächlich die neutrale Reaction der Milch aus oben erörterten Gründen an der Hemmung der Toxinbildung in der Milch Schuld ist und dass dem Milchzucker als solchen ein wesentlicher Einfluss bei der Hinderung der Toxinbildung in der Milch nicht zugeschrieben werden kann<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> Die Frage der praktischen Bedeutung der Toxinbildung in der Milch

Was nun die Frage anbetrifft, ob die Toxine Eiweisskörper sind und aus dem Eiweiss stammen, so haben neuerdings Brieger und Boer<sup>1)</sup> für das Diphtherie- und Tetanusgift nachgewiesen, dass das in Culturen gebildete Gift kein Eiweisskörper ist; dasselbe ist der Fall für das im menschlichen Organismus gefundene Tetanustoxin, wie ich im Blut und dem Rückenmark an Tetanus Erkrankter festgestellt habe<sup>2)</sup>. Da, wie wir gesehen haben, in der Milch unter den beobachteten Verhältnissen keine Eiweisszersetzung stattfindet, vorausgesetzt, dass man als Kriterium derselben die Bildung der bekannten Stoffwechselprodukte betrachtet, andererseits aber in derselben Toxine gebildet werden, so geht damit im Einklang mit dem Resultat Buchner's die immer noch so heftig bekämpfte Thatsache hervor, dass die Toxine überhaupt nicht aus dem Eiweiss des Zersetzungsmaterials zu stammen brauchen; ja, es zeigen gerade die Versuche an Milch, dass die Bakterien, obwohl ihnen reichlich Eiweisskörper zur Zersetzung dargeboten werden, dieselben dennoch zur Toxinbildung verschmähen.

Zum Schluss ist es mir eine besondere Ehre, Herrn Professor E. Salkowski für seine liebenswürdige Unterstützung bei dieser Arbeit zu danken.

spielt insofern in der Medicin eine grosse Rolle, als die Toxine, welche durch den Genuss verdorbener Milch in den Organismus eingeführt werden, zur Erklärung aller möglichen Intoxicationerscheinungen beim Menschen herangezogen werden. Diese Versuche zeigen aber, dass man dazu so ohne Weiteres kein Recht hat. Wenigstens ist die Toxinbildung in neutraler Milch, die doch allein genossen wird, bei den hier untersuchten 3 Bakterienarten eine sehr geringe gewesen. Man bedenke, dass Milch, welche die äusseren Zeichen der Zersetzung trägt, nicht getrunken wird. Ausserlich unverdorbene Milch kann aber nur minimale Spuren von Toxin enthalten, welche eine toxische Schädigung des Organismus per os unmöglich verursachen können. Damit soll nichts gesagt sein gegen die Infektionsgefahr, die Milch darbietet, welche pathogene Keime enthält.

<sup>1)</sup> Zeitschr. für Hygiene. 1896. Heft 1.

<sup>2)</sup> Zeitschr. für klin. Med. Bd. 30. Heft 5 und 6. 1896.