

## Studien zur Chemie des *Bacillus subtilis*.

Von

**G. Vaudevelde.**

Doctor der Naturwissenschaften und Medicin, physiologischer Assistent  
an der Universität Gent.

---

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium zu Strassburg i. E.)

(Der Redaktion zugegangen am 25. April 1884.)

Pasteur zeigte 1881 in Gemeinschaft mit Chamberland und Roux, dass man den Milzbrandbacillus in den verschiedensten Graden der Ansteckungsfähigkeit erhalten kann, und zwar von äusserster Giftigkeit bis zu völliger Unschädlichkeit, je nachdem man die Bakterien öfter in Hühnerbouillon von 42—43° züchtet, ferner dass die Pilze bei dieser Temperatur und bei Gegenwart von Luft mikroskopisch keine Spur von Sporen zeigen und dass man so die ursprüngliche Ansteckungsfähigkeit hindert, sich irgendwie zu äussern, und die so gezüchteten Pilze in ihrer Wirkung mehr und mehr abgeschwächt werden. Nach einer Züchtung von 48 Tagen erhielt er so einen Milzbrandbacillus, der nicht mehr im Stande war, Mäuse oder Meerschweinchen zu tödten<sup>1)</sup>. Damals lernte man also die Umwandlung des giftigen Bacterium in eine unschädliche Form von derselben morphologischen Beschaffenheit kennen; es ist gut, hier daran zu erinnern, dass man nach Pasteur die unschädliche Form nur dadurch in die giftige zurückführen kann, dass man zu Thieren greift, die ganz von den für Milzbrandinfection empfänglichen verschieden sind.

<sup>1)</sup> Comptes rendus, t. XCII, p. 429 u. 666.

In Deutschland veröffentlichte etwas später Hans Buchner eine sehr interessante Arbeit «über die experimentelle Erzeugung des Milzbrandcontagiums aus den Heupilzen»<sup>1)</sup>, in der er zu denselben Resultaten gelangte: je länger der Milzbrandbacillus in einer Lösung von Fleisch-extract bei Gegenwart von Sauerstoff gezüchtet wurde, desto mehr wurde seine giftige Wirkung abgeschwächt. Durch fortgesetzte Züchtung erhielt er so eine erste Bacillengeneration, von der die geringste Menge noch hinreichte, kleine Thiere, wie Mäuse und Meerschweinchen, zu tödten, von der 2., 3. und 4. musste er dann Mengen anwenden, die mit der Reihenfolge der Generation wuchsen, von der 5. war schon eine grosse Quantität nöthig, die 6. Generation endlich war völlig wirkungslos. Auch nach ihm hatte sich weder die morphologische Beschaffenheit noch die Sporenbildung oder die Entwicklung noch auch der chemische Charakter merklich geändert, in allen diesen Punkten stimmte die 36. Generation völlig mit der ersten überein; die einzige Veränderung bestand in der Abschwächung der Ansteckungsfähigkeit. Er weist die Ansicht zurück, dass der Milzbrandpilz sein Gift aus dem erkrankten Organismus selbst zieht, dass er also eine Substanz enthält, die aus einem erkrankten Organismus entlehnt ihn erst in Stand setzt, andere Organismen zu inficiren, und beweist, dass die Bacterien selbst durch die Züchtung in künstlichen Nährflüssigkeiten allmähig ihre Beschaffenheit ändern; seiner Ansicht nach war ihm die Umzüchtung des bacterium anthracis in bacterium subtile gelungen. Die erste Frage, die sich nun erhob, war die, ob das bacterium subtile seinerseits wieder seine Beschaffenheit ändern und zum bacterium anthracis werden könne; er giebt an, dass dem so sei. Durch Züchtung des bacterium subtile in defibrinirtem Blut von 36° erhielt er eine giftige Form, die bei ihrer Einführung ins Blut gesunder Thiere schon in kleinsten Quantitäten deren Tod bewirkte; bei der Autopsie fand er

<sup>1)</sup> Untersuchungen über niedere Pilze aus dem pflanzenphysiologischen Institut in München von Prof. G. v. Nägeli S. 140.

alle Kennzeichen, die bei durch Vergiftung mit Milzbrandbakterien getödteten Thieren vorkommen.

Nun wissen wir, dass der *Bacillus anthracis* die Abwesenheit von Sauerstoff nicht lange erträgt, auch haben Pasteur und Joubert bewiesen, dass dieser Microorganismus in Gegenwart von  $\text{CO}_2$  abstirbt<sup>1)</sup>. Allerdings giebt Joseph Spilmann in einer Arbeit «über das Verhalten der Milzbrandbacillen in Gasen»<sup>2)</sup> an, dass er noch Vergiftungserscheinungen durch den *Bacillus anthracis* bekam, wenn er ihn 5—8 Stunden lang mit  $\text{CO}_2$  behandelt hatte, aber nach 24 Stunden lässt er den Tod eintreten. Verhält es sich mit dem *Bacillus subtilis* ebenso? Kann dieser nicht längere oder kürzere Zeit die ihm zum Leben nöthige Wärme auf Kosten gährungsfähiger Substanzen bilden? Diese Frage war bis jetzt weit von ihrer Lösung entfernt, und es herrschten in der Wissenschaft die widersprechendsten Meinungen über sie.

Die Versuche, die ich im Strassburger Laboratorium angestellt habe, haben mich bestimmt davon überzeugt, dass das *Bacterium subtile* sehr wohl im Stande ist als Ferment zu leben. Nach Cohn kann der bei Abwesenheit von Luft gezüchtete *Bacillus subtilis* die Kohlenhydrate in Buttersäure umwandeln<sup>3)</sup>, dagegen behauptete Hans Buchner, dass er niemals die geringste Spur von Gährungsvorgängen durch diesen Pilz beobachtet habe, und beruft sich zur Stütze seiner Ansicht vor allem auf die Arbeit von Prazmowski<sup>4)</sup>. Dieser Autor brachte Sporen des *Bacillus subtilis* in Glasröhren, die halb mit gährungsfähiger Flüssigkeit gefüllt waren, kochte dann die Flüssigkeit und schmolz die Glasröhren zu. Er behauptete so alle Luft aus den Röhren entfernt zu haben, und konnte dann niemals Entwicklung von Bacillen oder die

1) Pasteur et Joubert: Etude sur la maladie charbonneuse. Comptes rendus, t. 84, p. 900 (1877).

2) Zeitschrift für physiologische Chemie. Bd. IV, S. 362.

3) Cohn: Beiträge zur Biologie der Pflanzen.

4) Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bacterienarten.

geringste Spur von Gährungsprodukten finden. Dies Resultat scheint mir kein genügender Beweis dafür zu sein, dass der *Bacillus subtilis* nicht als Ferment leben könne, denn wie wir aus den Arbeiten Brefeld's und aus der neuen Arbeit Hoppe-Seyler's wissen<sup>1)</sup>, wie es auch die Resultate beweisen, die ich bei der Cultur des *Bacillus* in Fleischextract erhielt, hat er zu seiner Entwicklung und Fortpflanzung freien Sauerstoff nöthig. Dass also Prazmowski die wenigen Sporen, die er in die Menge der gährungsfähigen Flüssigkeit versenkt hatte, nach 4—5 Tagen nicht mehr mikroskopisch auffinden konnte, dass selbst chemisch nicht die geringsten Gährungsproducte nachweisbar waren, das nimmt mich gar nicht Wunder. Ich weiss wohl, dass nach Nägeli die Gährung, die nur in der Auslösung einer gewissen Menge lebendiger Kraft besteht, die Entwicklung und Vermehrung begünstigen muss. « Wird die Nährflüssigkeit unter Luftabschluss gehalten, so besteht ausser der Assimilationsfähigkeit der organischen Verbindungen noch die fernere Bedingung für das Wachstum der Pilzzellen, dass dieselben eine Gährthätigkeit von einem bestimmten Intensitätsgrad ausüben. Die Ernährung und Vermehrung der Pilze unterbleibt vollständig, wenn das Gährvermögen jenen Grad nicht erreicht, und ist um so lebhafter, je mehr es ihn überschreitet »<sup>2)</sup>. Indessen weiss ich nicht, ob die Ansicht des Autors sich auf directe Versuche stützt; jedenfalls haben die oben erwähnten Autoren Brefeld und Hoppe-Seyler bewiesen, dass die Bierhefe sich nur bei Gegenwart von freiem Sauerstoff vermehrt, der letztere Autor behauptet dies sogar für alle Organismen aus der Gruppe der Spaltpilze, und die Resultate, die ich bei der Cultur des *Bacillus subtilis* in Fleischextract erhalten habe, beweisen bestimmt, dass dem so ist. Damit nun die Analyse Resultate ergibt, ist es augenscheinlich nöthig, dass der *Bacillus* eine gewisse Zeit gehabt hat, sich zu entwickeln, und da er bei Abwesenheit von Sauerstoff zu seinem Lebens-

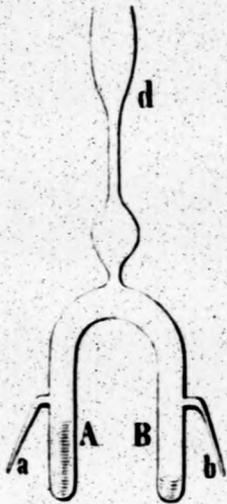
1) Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. VIII, S. 226.

2) Nägeli: Ernährung der niederen Pilze durch Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen, S. 32.

unterhalt der Gährung bedarf, kann man nicht erwarten, nach 4–5 Tagen Gährungsproducte zu finden, selbst wenn die Züchtung in geschlossenen Glasröhren geschah.

Prazmowski giebt auch an, dass, wenn er etwas Luft in seinen Glasröhren liess, der Bacillus sich entwickelte, aber immer nur auf der Oberfläche der Flüssigkeit ein sehr dünnes Häutchen bildete, das sich verdichtete, wenn er der äusseren Luft freien Zutritt zum Inneren der Röhren gestattete. Dies stimmt vollständig mit dem Satze überein, dass ohne freien Sauerstoff keine Entwicklung, keine Vermehrung möglich ist, und dass die Entwicklung und Vermehrung der Menge der in der Röhre enthaltenen Luft proportional ist.

Chamberland stellte dieselben Untersuchungen an wie Prazmowski und gelangte zu denselben Resultaten. Wir führen hier eines seiner Experimente an: Er benutzte die umgekehrte U-förmige Röhre Pasteur's, brachte in den Schenkel A eine sterilisirte Nährflüssigkeit und dieselbe Flüssigkeit, aber mit einigen Sporen, in B, dann schmolz er das Rohr d zu. Im Schenkel B fand nun Entwicklung von Bacillen statt. Nach einigen Tagen, als der in der Röhre enthaltene Sauerstoff von den Organismen des Schenkels B absorbiert war, versetzte er die unverändert gebliebene Flüssigkeit in A mit einem Tropfen aus dem Schenkel B; es fand keine Entwicklung von Bacillen statt und die Flüssigkeit in A blieb klar. Liess er nun Luft eintreten, so fand Entwicklung von Bacillen statt. Augenscheinlich finden hier dieselben Bemerkungen Anwendung, die ich bei den Prazmowski'schen Versuchen gemacht habe. Meines Wissens hat Chamberland keine chemischen Untersuchungen angestellt.



Meine Untersuchungen waren zunächst auf die Veränderungen gerichtet, die das *Bacterium subtilis* im Fleischextract hervorbringt; ich bediente mich bei denselben des Liebig'schen Fleischextractes aus Fray Bentos (Uruguay).

Um das *Bacterium subtilis* zu erhalten, bediente ich mich des von Roberts und Buchner angewendeten Verfahrens,

1) Annales scientifiques de l'ecole normale supérieure. 2<sup>e</sup> série, t. VII, p. 88.

das sehr einfach ist und Culturen ergibt, die ganz frei von anderen Mikroorganismen sind. Das Verfahren ist folgendes: Man hält einen Heuaufguss, der mit möglichst wenig Wasser bereitet ist, etwa 4 Stunden lang bei einer Temperatur von  $36^{\circ}$ , giesst dann die Flüssigkeit ab, bringt sie auf eine Dichte von 1,004 und füllt Literkolben zur Hälfte damit an. Dann verschliesst man den Kolben mit einem Wattepfropf und erhitzt die Flüssigkeit (vor dem Erhitzen überzeugt man sich, ob die Flüssigkeit nicht zu sauer ist; sollte sie es sein, so wird sie vorher mit  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  neutralisirt). Nachdem die Flüssigkeit eine Stunde lang erhitzt ist, erhält man sie bei einer Temperatur von  $36^{\circ}$  und bekommt so nach 30 Stunden eine sehr reiche Cultur von *Bacterium subtile*.

Es wurden nun drei Kolben von genau gleicher Beschaffenheit mit einer vorher gekochten und filtrirten Lösung von Fleischextract zur Hälfte angefüllt. Der eine enthielt  $2\frac{1}{2}$  gr. Fleischextract auf 500 gr. Wasser, der andere 5, der dritte 10 gr. auf dieselbe Quantität Wasser. Die Kolben wurden nun mit einem Wattepfropf verschlossen, die Lösung dann gekocht und etwa eine Stunde lang auf dem Siedepunkt erhalten. Nach dem Erkalten brachte ich mit Hülfe eines vorher erhitzten und mit Alkohol gereinigten Glasrohres eine Spur meiner Cultur von *Bacillus subtilis* in jede der Fleischextractlösungen. Ich erhielt die drei Kolben bei einer Temperatur von  $36^{\circ}$  und beobachtete dann Folgendes: Nach 24 Stunden trübte sich die anfangs klare Flüssigkeit, aber diese Trübung war nicht andauernd, denn nach 40–48 Stunden hellte sich die Flüssigkeit deutlich auf, obgleich sie ihre ursprüngliche Klarheit nicht wieder erlangte; gleichzeitig hatte sich auf ihrer Oberfläche eine Bacillushaut von matter grauweisser Farbe gebildet, die in der 10 gr. enthaltenden Lösung dicker war als in der von 5 gr., in dieser wieder dicker als in der von  $2\frac{1}{2}$  gr. Dasselbe beschreiben die oben erwähnten Autoren in ihren Arbeiten; aber der Vorgang ist damit noch nicht abgeschlossen. Das graue Häutchen verdickt sich einige Zeit lang, verliert seine matte Farbe, wird glänzender und von gleichmässigerer Oberfläche. Bald aber

springt es an verschiedenen Stellen auf, und die einzelnen Stücke fallen auf den Boden des Gefässes. Nach dem Verschwinden der ersten Bacillenhaut erscheint oft eine neue, aber so dünn, dass sie durchscheinend ist, auch diese verschwindet dann wieder und nach drei Wochen zeigt die Oberfläche der Flüssigkeit nur ein ganz dünnes durchscheinendes und kaum sichtbares Häutchen. Untersucht man in dieser Zeit mikroskopische Proben der Flüssigkeit, die aus verschiedenen Tiefen derselben entnommen sind, so überzeugt man sich, dass die Bacterien sich überall zerstreut in ihr befinden. Meiner Ansicht nach sind diese Erscheinungen so zu erklären: in den ersten Tagen leben und vermehren sich die Bacterien auf Kosten des in der Flüssigkeit enthaltenen Sauerstoffs, aber bald geht dieser aus, und dann begeben sie sich auf die Oberfläche, wo sie noch als wahre Aërobien erscheinen und unter Absorption von Sauerstoff leben und sich vermehren. Zieht man die sehr interessanten Untersuchungen Hoppe-Seyler's in Betracht, der bewiesen hat, dass in den Flüssigkeiten im Ruhestand und in der Gährung nur die ganz oberflächliche Schichte Sauerstoff enthält<sup>1)</sup>, so muss man sich allerdings fragen, wie es im vorliegenden Fall mit dieser Schichte steht, wenn die Oberfläche der Flüssigkeit mit einer Bacillenhaut bedeckt ist, die oft eine Dicke von  $1\frac{1}{2}$  mm. hat? Die oberflächliche Schichte dieser Membran absorbirt sehr viel Sauerstoff und lässt dieses Gas nicht zu den tieferen Schichten dringen, in denen Prazmowski keine Sporenbildung mehr beobachten konnte<sup>2)</sup>. In diesen tieferen Schichten entwickeln und vermehren sich die Bacterien nicht mehr und sind gezwungen, die ihnen nöthige Wärme auf Kosten der gährungsfähigen Substanz zu bilden. Bald theilt sich die Bacillenhaut und fällt auf den Boden des Gefässes, dann stirbt ein Theil der Bacillen ab und bleibt unten, ein anderer Theil bildet auf

1) Ueber die Einwirkungen des Sauerstoffs auf Gährungen, 1881, und Zeitschrift für physiologische Chemie Bd. I, S. 129.

2) Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bacterienarten, S. 17.

der Oberfläche eine neue, aber diesmal sehr dünne Haut, ein dritter Theil endlich lebt als Ferment und schwimmt in der Flüssigkeit. Dies beweisen übrigens auch meine Analysen.

Mit den drei erwähnten Kolben wurden die Versuche am 23. November 1883 begonnen, der mit den 5 gr. Fleisch-extract wurde am 7. Dezember, der mit  $2\frac{1}{2}$  gr. am 11., der mit 10 gr. am 16. desselben Monats analysirt.

Da man bei dieser Art von Untersuchungen immer gut thut, die eingeschlagene Methode anzugeben, damit die erhaltenen Resultate nöthigenfalls controlirt werden können, theile ich hier kurz den Gang meiner Analyse mit.

Zunächst überzeugte ich mich durch eine mikroskopische Untersuchung, ob die erhaltene Cultur nur aus *Bacillus subtilis* bestand, und ob dieser im Augenblick der Analyse noch lebte; dann theilte ich die Flüssigkeit in drei gleiche Theile. Den ersten Theil benutzte ich zur Bestimmung von  $\text{NH}_3$  und der flüchtigen Fettsäuren, deren Baryumsalze in Wasser löslich sind, den zweiten Theil zur Bestimmung der Materien, die zum Aufbau des *Bacillus* dienen, und die in einer erhitzten sauren Lösung unlöslich sind; ferner bestimmte ich in diesem zweiten Theile noch die Milchsäure und das Kreatin. Auch die Menge des von den Bacterien hervorgebrachten Peptons hätte ich hier bestimmen können, aber wie man noch sehen wird, habe ich nie die geringste Spur davon gefunden. Den dritten Theil endlich stellte ich für den Fall zurück, dass sich bei der Analyse ein Unfall ereignen sollte.

#### Bestimmung von $\text{NH}_3$ .

Ich bediente mich des Verfahrens, das Pasteur bei Analysen dieser Art 1860 angewendet hat. Es besteht in der Destillation der Flüssigkeit mit einer gewissen Menge von  $\text{MgO}$ , das Destillat wird in einer Lösung von  $\text{HCl}$  aufgefangen, auf dem Wasserbade eingedampft und bei  $100^\circ$  getrocknet. Auf diese Weise hat man jede Spur von freiem  $\text{HCl}$  entfernt, und die so erhaltenen Krystalle von  $\text{ClNH}_4$  wurden als Ammonium-Platinchlorid bestimmt; um mich endlich zu überzeugen, dass das von den Bacillen erzeugte

$\text{NH}_3$  reines  $\text{NH}_3$  sei, bestimmte ich noch das Platin des Niederschlages.

Die Analyse der drei Kolben, die alle noch den *Bacillus subtilis* in lebendigem Zustand enthielten, ergab nun Folgendes:

**A.** 5 gr. Extrakt auf 500 gr. Wasser.

(23. Nov. bis 7. Dez.)

0.476  $(\text{NH}_4)_2 \text{PtCl}_6$     0.03638  $\text{NH}_3$

0.21 Pt                    0.03631  $\text{NH}_3$

Die ganze Flüssigkeit enthielt also 0,108  $\text{NH}_3$ .

**B.**  $2\frac{1}{2}$  gr. Extrakt auf 500 gr. Wasser.

(23. Nov. bis 11. Dez.)

0.244  $(\text{NH}_4)_2 \text{PtCl}_6$     0.0186  $\text{NH}_3$

0.107 Pt                    0.0185  $\text{NH}_3$

Die ganze Flüssigkeit enthielt also 0,055  $\text{NH}_3$ .

**C.** 10 gr. Extrakt auf 500 gr. Wasser.

(23. Nov. bis 16. Dez.)

0.81  $(\text{NH}_4)_2 \text{PtCl}_6$     0.0618  $\text{NH}_3$

0.35 Pt                    0.0606  $\text{NH}_3$

Die ganze Flüssigkeit enthielt also 0,182  $\text{NH}_3$ .

In zwei anderen Kolben, von denen der eine  $2\frac{1}{2}$  gr., der andere 5 gr. Extrakt auf je 500 gr. Wasser enthielt, wurden seit dem 7. Dezember 1883 Versuche derselben Art angestellt. Sie ergaben Folgendes:

**D.**  $2\frac{1}{2}$  gr. Extrakt auf 500 gr. Wasser.

(7. Dez. 1883 bis 9. Januar 1884.)

0.274  $(\text{NH}_4)_2 \text{PtCl}_6$     0.0209  $\text{NH}_3$

0.12 Pt                    0.0207  $\text{NH}_3$

Die ganze Flüssigkeit enthielt also 0,062  $\text{NH}_3$ .

**E.** 5 gr. Extrakt auf 500 gr. Wasser.

(7. Dez. 1883 bis 25. Januar 1884.)

0.521  $(\text{NH}_4)_2 \text{PtCl}_6$     0.0398  $\text{NH}_3$

0.23 Pt                    0.0397  $\text{NH}_3$

Die ganze Flüssigkeit enthielt also 0,119  $\text{NH}_3$ .

Eine Lösung von 5 gr. Fleischextrakt auf 500 gr. Wasser, die keine Bacillen enthielt, im Uebrigen auf dieselbe Weise behandelt und analysirt wurde, ergab das eine Mal:

0.062  $(\text{NH}_4)_2 \text{PtCl}_6$     0.0047  $\text{NH}_3$

0.027 Pt                    0.0046  $\text{NH}_3$

Die ganze Flüssigkeit enthielt also 0,014  $\text{NH}_3$ .

Das andere Mal:

0,057 $(\text{NH}_4)_2 \text{PtCl}_6$	0,0043 $\text{NH}_3$
0,027 Pt	0,0041 $\text{NH}_3$

Die ganze Flüssigkeit enthielt also 0,012  $\text{NH}_3$ .

Diese Zahlen beweisen uns zunächst, dass die Menge des gebildeten Ammoniaksalzes der Menge des in der Flüssigkeit enthaltenen Extractes direct proportional ist; ferner, dass  $\text{NH}_3$  sich besonders in den ersten Tagen der Thätigkeit der Bacterien bildet, und dass dies  $\text{NH}_3$ , das grösstentheils in der Periode der Entwicklung und Vermehrung der Bacillen durch die Assimilation stickstoffhaltiger Substanzen entsteht, nach den ersten Tagen sich nur unbedeutend vermehrt.

#### Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren.

Der Rest der Flüssigkeit, der nach dem Abdestilliren von  $\text{NH}_3$  übrig blieb, wurde auf ein kleines Volumen eingedampft, dann stark mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  angesäuert und darauf einer vollständigen Destillation unterworfen, wenigstens so lange bis  $\text{H}_2\text{SO}_4$  die Flüssigkeit braun färbte und man daher sicher sein konnte, dass die flüchtigen Fettsäuren überdestillirt waren. Das Destillationsproduct wurde darauf einige Zeit lang der Einwirkung einer geringen Menge von frisch ausgefälltem  $\text{AgO}$  ausgesetzt, um das  $\text{HCl}$ , das den Chloriden des Fleischextractes angehörte, zu entfernen. Dann wurde das Silber der Lösung durch einen Strom  $\text{H}_2\text{S}$  gefällt und filtrirt, das überschüssige  $\text{H}_2\text{S}$  durch einen Strom  $\text{H}_2$  entfernt, und darauf die Fettsäuren durch etwas  $(\text{HO})_2\text{Ba}$  in die Baryumsalze umgewandelt. Dann schlug ich das überschüssige  $(\text{HO})_2\text{Ba}$  durch einen Strom  $\text{CO}_2$  nieder, kochte die Flüssigkeit in Gegenwart von  $\text{CO}_3\text{Ba}$  einige Zeit lang, filtrirte, dampfte auf dem Wasserbad ein und erhielt so die in Wasser löslichen Baryumsalze der Fettsäuren.

Um die quantitative Analyse der flüchtigen Fettsäuren im Fleischextract zu ermöglichen, bestimmte ich in 10 gr. desselben erst  $\text{NH}_3$  und dann die Fettsäuren, und erhielt von letzteren einmal 0,036, ein anderesmal 0,041, ein drittesmal 0,032, so dass man im Mittel 0,32—0,41 Procent flüchtiger

Fettsäuren in ihren Baryumsalzen im Fleischextract annehmen kann.

Die Analyse der zwei ersten Flüssigkeiten (A und B), von denen ich zur Bestimmung der Fettsäuren nur über ein Drittel des Gesamtvolumens verfügte, ergab so unbedeutende Quantitäten, dass sie für eine quantitative Analyse unbrauchbar waren. Die Flüssigkeit C (23. Nov. bis 16. Dec.) ergab für ein Drittel 0,096, also 2,88 %, die Flüssigkeit E (7. Dec. bis 25. Jan.) 0,081, also 4,8 %. Diese Zahlen ergaben nicht nur eine Vermehrung der flüchtigen Fettsäuren, sondern auch, dass diese Vermehrung hauptsächlich in der letzten Zeit der Thätigkeit der Bacterien geschieht.

**Bestimmung der unlöslichen Substanzen, aus denen der Bacillus zusammengesetzt ist, der Milchsäure und des Kreatins.**

Das zweite Drittel der gut geschüttelten Flüssigkeit, die überall eine gleichmässige Trübung darbot, wurde mit Essigsäure angesäuert, eine Viertelstunde lang gekocht und dann filtrirt; das Filter war vorher gewaschen, getrocknet und gewogen. Diese Filtration ist immer schwierig, obgleich die Flüssigkeit mit Essigsäure erhitzt ist, doch ist sie keineswegs unmöglich, das eine Mal leichter als das andere, mit Einschluss des Auswaschens brauchte ich nie mehr als 2 Stunden dazu. Ich erhielt auf diese Weise die Substanzen, aus denen die Bacillen bestehen, und die in kochendem angesäuerten Wasser unlöslich sind.

Die Resultate sind folgende:

**A.** 5 gr. Extrakt auf 500 gr. Wasser.  
(23. Nov. bis 7. Dez.)

Für  $\frac{1}{3}$  der Flüssigkeit erhielt ich 0,09, auf's Ganze berechnet also 0,27.

**B.**  $2\frac{1}{2}$  gr. Extrakt auf 500 gr. Wasser.  
(23. Nov. bis 11. Dez.)

Für  $\frac{1}{3}$  der Flüssigkeit erhielt ich 0,038, für's Ganze 0,114.

**C.** 10 gr. Extrakt auf 500 gr. Wasser.  
(23. Nov. bis 16. Dez.)

Für  $\frac{1}{3}$  der Flüssigkeit erhielt ich 0,166, für's Ganze 0,498.

**D.** 2 $\frac{1}{2}$  gr. Extract auf 500 gr. Wasser.  
(7. Dez. bis 9. Jan.)

Für  $\frac{1}{3}$  der Flüssigkeit erhielt ich 0.041, für's Ganze 0.123.

**E.** 5 gr. Extract auf 500 gr. Wasser.  
(7. Dez. bis 25. Jan.)

Für  $\frac{1}{3}$  der Flüssigkeit erhielt ich 0.102, für's Ganze 0.306.

Diese Zahlen beweisen, dass die Entwicklung und Vermehrung der Bacillen der Quantität des Fleischextractes direct proportional ist, und dass diese Entwicklung und Vermehrung besonders in den ersten Tagen vor sich geht. Später spielt sie keine grosse Rolle mehr, da eine Flüssigkeit mit 5 gr. Fleischextract, die bei der Untersuchung nach 14 Tagen 0,27 gr. in Wasser unlösliche Substanzen ergibt, 34 Tage mehr gebraucht, um ihren Gehalt daran bis auf 0,306 zu erhöhen. Diese geringe Erhöhung kommt auf Rechnung der Entwicklung und Vermehrung der Bacillen, die in dem mit blossen Auge kaum sichtbaren Häutchen geschieht, das auf der Oberfläche schwimmt. Es ist gut daran zu erinnern, dass meine Kolben durchaus von gleicher Beschaffenheit waren, und dass daher die Flüssigkeit in ihnen der Berührung mit der Luft eine gleich grosse Fläche darboten.

Es wird nun der filtrirte Theil der Flüssigkeit mit  $H_2SO_4$  erhitzt, um das Kreatin in Kreatinin überzuführen, dann mit Phosphorwolframsäure gefällt, der Niederschlag durch Filtration isolirt und mit Wasser, das 5%  $H_2SO_4$  enthält, ausgewaschen. Dann befreit man das Filter durch Schütteln im destillirten Wasser vollständig vom Niederschlage, neutralisirt die Flüssigkeit mit  $CO_3Ba$  und filtrirt wieder. Oft bleibt nach dem Filtriren eine Trübung zurück, es rührt davon einer Spur von  $CO_3Ba$ , die mitdurchfiltrirt ist, und die man durch Kochen entfernen kann. Die so filtrirte Flüssigkeit enthält das Kreatinin und das Pepton. Man dampft sie auf dem Wasserbade bis zur Syrupconsistenz ein, behandelt sie mit absolutem Alkohol, der das Kreatinin löst, und fällt das Pepton aus. In dem Niederschlag habe ich niemals mit Hülfe der Biuretreaction die geringste Spur von Pepton nachweisen können.

Die alkoholische Lösung des Kreatinins wurde nun theilweise eingedampft, um nicht zu viel Lösung zu haben, und das Kreatinin als  $(C_4H_7N_3O)_2ZnCl_2$  gefällt. Die Resultate waren folgende:

Ein Drittel einer Lösung von 5 gr. Fleischextract in 500 gr. Wasser wurde auf angegebene Weise behandelt und ergab ein Mal:

0,162  $(C_4H_7N_3O)_2ZnCl_2$ , also 6,02<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Kreatinin.

Ein anderes Mal:

0,159  $(C_4H_7N_3O)_2ZnCl_2$ , also 5,91<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Kreatinin.

Dagegen ergab:

Der Kolben A (5 gr. Extract auf 500 gr. Wasser, 23. Nov. bis 7. Dez.):

0,074  $(C_4H_7N_3O)_2ZnCl_2$  auf  $\frac{1}{3}$ , also 2,75<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Kreatinin.

Der Kolben B (2 $\frac{1}{2}$  gr. Extract auf 500 gr. Wasser, 23. Nov. bis 11. Dez.):

0,036  $(C_4H_7N_3O)_2ZnCl_2$  auf  $\frac{1}{3}$ , also 2,67<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Kreatinin.

Der Kolben C (10 gr. Extract auf 500 gr. Wasser, 23. Nov. bis 16. Dez.):

0,147  $(C_4H_7N_3O)_2ZnCl_2$  auf  $\frac{1}{3}$ , also 2,77<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Kreatinin.

Der Kolben D (2 $\frac{1}{2}$  gr. Extract auf 500 gr. Wasser (7. Dez. bis 9. Jan.):

0,033  $(C_4H_7N_3O)_2ZnCl_2$  auf  $\frac{1}{3}$ , also 2,44<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Kreatinin.

Der Kolben E (5 gr. Extract auf 500 gr. Wasser, 7. Dez. bis 25. Jan.):

0,068  $(C_4H_7N_3O)_2ZnCl_2$  auf  $\frac{1}{3}$ , also 2,52<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Kreatinin.

Dies beweist uns, dass das Kreatinin besonders zur Assimilation benutzt wird, die der Entwicklung und Vermehrung der Bacillen proportional ist. Gleichgiltig, ob man die Flüssigkeit untersucht, wenn die Bacterien ihre Thätigkeit 14 Tage oder 1 $\frac{1}{2}$  Monat lang ausgeübt haben; der Ausfall an Kreatinin bleibt ungefähr derselbe (die kleine Differenz liegt innerhalb der Fehlergrenzen). Dies Resultat war übrigens vorauszusehen, da die Assimilation nach 10 bis 14 Tagen nur noch in sehr kleinem Maasstab vor sich geht, und ihr in Fleischextract noch andere stickstoffhaltige Substanzen zu Gebote stehen.

#### Bestimmung der Milchsäure.

Der durch die Phosphorwolframsäure nicht gefällte Theil der Flüssigkeit wird durch  $CO_2Ba$  neutralisirt, und dann

durch Filtriren und Auswaschen das milchsaure Baryum von dem schwefel- und phosphorwolframsaurem Baryum getrennt. Ich dampfte die Flüssigkeit auf dem Wasserbade bis zu Syrupconsistenz ein, säuerte mit HCl an und schüttelte mit Aether; nach zweitägigem Schütteln, wobei der Aether dreimal erneuert wurde, erhielt ich so den Aetherauszug der Milchsäure, und durch Verdampfen des Aethers auf dem Wasserbade die Milchsäure. Ich löste dann dieselbe in Wasser auf und behandelte sie zunächst mit einer gewissen Menge von frisch niedergeschlagenem AgO, um das HCl zu entfernen, das die Lösung enthalten konnte. Dann filtrirte ich, fällte das Silber des milchsauren Silbers als  $S\text{Ag}_2$ , und dampfte die so frei gewordene Milchsäure nach Filtration der Flüssigkeit langsam und bei niedriger Temperatur ein, um ihre Zerlegung zu verhüten. So von  $\text{H}_2\text{S}$  befreit löste ich sie in wenig Wasser, neutralisirte mit  $\text{CO}_3\text{Ca}$ , filtrirte, und erhielt so das krystallisirte Calciumsalz der Fleischmilchsäure,  $(\text{C}_8\text{H}_5\text{O}_3)_2\text{Ca} + 4\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ . Die Resultate sind folgende:

Der dritte Theil einer Lösung von 5 gr. Fleischextract auf 500 gr. Wasser wurde auf die oben beschriebene Art behandelt und ergab 0,075 des crystallisirten Calciumsalzes der Milchsäure, das Fleischextract enthielt also 2,6% Fleischmilchsäure. Eine andere gleiche Lösung ergab 0,069, also 2,5% Fleischmilchsäure im Extract.

Ich erhielt also immer etwas mehr als Wislicenus<sup>1)</sup>, der nur 2% reine Fleischmilchsäure aus dem Fleischextract erhielt; trotzdem zeigte sich das erhaltene Calciumsalz der Fleischmilchsäure, abgesehen von einzelnen Verunreinigungen, die sich unmöglich vermeiden lassen, mikroskopisch als vollkommen rein krystallisirt.

Der Kolben A (5 gr. Extract auf 500 gr. Wasser, 23. Nov. bis 7. Dez.) ergab 0,039 Calciumsalz, also 1,6% Fleischmilchsäure.

Im Kolben B konnte ich in Folge einiger Unfälle die Bestimmung der Fleischmilchsäure nicht ausführen.

1) Darstellung der Paramilchsäure aus Fleischextract. *Annalen der Chemie und Pharmacie*, Jahrg. 1873, Bd. 167–168, S. 304.

Der Kolben **C** (10 gr. Extract auf 500 gr. Wasser, 23. Nov. bis 16. Dez.) ergab 0,051 Calciumsalz, also 0,92% Fleischmilchsäure.

Der Kolben **D** (2 $\frac{1}{2}$  gr. Extract auf 500 gr. Wasser, 7. Dez. bis 9. Jan.) ergab kaum 0,007 Calciumsalz, also 0,51% Fleischmilchsäure.

Der Kolben **E** (5 gr. Extract auf 500 gr. Wasser, 7. Dec. bis 25. Jan.) ergab 0,008 Calciumsalz, also 0,28% Fleischmilchsäure.

Die Fleischmilchsäure nimmt also von den ersten 14 Tagen an ab, und diese Verminderung wächst mit der Dauer der Thätigkeit der Bacterien; nach sieben Wochen ist die Menge der Fleischmilchsäure fast Null.

Ich muss hier erwähnen, dass Fitz in seiner Arbeit über die Lebensthätigkeit des *Bacillus subtilis*<sup>1)</sup> angiebt, dass derselbe im milchsauren Calcium keine Gährung hervorrufft. Darnach scheint es, als ob er sich gegenüber der Fleischmilchsäure anders verhielte, da Fitz nur mit Gährungsmilchsäure gearbeitet hat. Es wäre dies noch weniger wunderbar, als die Beobachtungen, die Pasteur bei der Rechtsweinsäure und Linksweinsäure gemacht hat; indessen hat mir der Fortgang meiner Arbeit bewiesen, dass der nach dem Verfahren von Roberts und Buchner erhaltene *Bacillus* ein ganz anderer ist, als der von Fitz, der mit Glycerin Aethylalkohol ergiebt.

Stellen wir jetzt die erhaltenen Resultate zusammen, so sehen wir, dass gemäss dem oben Gesagten die starke Assimilation, die in Beziehung zur Entwicklung und Vermehrung der Bacillen steht, und an der Oberfläche vor sich geht, zunächst die grosse Menge  $\text{NH}_3$ , die sich in den ersten Tagen bildet, und das Verschwinden des Kreatins erklärt. Später stirbt ein grosser Theil der Bacillen ab und fällt auf den Boden des Gefässes, ein anderer bildet ein kaum sichtbares Häutchen auf der Oberfläche und lebt als Aerobie, ein dritter endlich wirkt als Ferment und bedingt das allmälige Verschwinden der Fleischmilchsäure und die Vermehrung der Fettsäuren.

1) Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. 11, S. 49

**Gährungsprodukte, die durch den Bacillus subtilis auf Kosten des Glycerins entstehen.**

Zwei Kolben mit Glycerinlösung wurden am 11. Januar in Untersuchung gezogen, die bei einer Temperatur von  $36^{\circ}$  geschah. Sie enthielten 5 cbem. Glycerin (6,12 gr.) auf 700 gr. Wasser, und  $2\frac{1}{2}$  gr. Fleischextract. Um die Flüssigkeit trotz der Gährung neutral zu erhalten, fügte ich nach dem Kochen eine gewisse Menge  $\text{CO}_3\text{Ca}$  hinzu, die einige Zeit hindurch der Temperatur von  $200^{\circ}$  ausgesetzt gewesen war. Beide Kolben standen durch einen Wattepfropf in Communication mit der Luft.

Ein dritter Kolben von etwa 800 cbem. Inhalt wurde mit derselben Lösung gefüllt und bis zum Erkalten mit einem Wattepfropf verschlossen. Dann brachte ich den Bacillus subtilis hinein, und setzte den Kolben durch einen Kautschukstopfen und eine Glasröhre, die vorher in Alkohol gewaschen waren, in Verbindung mit einem durch Quecksilber abgeschlossenen Gefäß, um die gasförmigen Gährungsprodukte darin aufzufangen. Der Kolben wurde am 26. Januar in Untersuchung genommen und bei einer Temperatur von  $36^{\circ}$  gehalten.

Der Gang der Analyse war folgender:

Um die Alkohole, die sich bilden konnten, zu erhalten, unterzog ich die vorher von den Niederschlägen von Calciumsalzen gereinigte Flüssigkeit einer theilweisen Destillation. Das Destillationsprodukt wurde mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  angesäuert und einer zweiten Destillation unterworfen, um  $\text{NH}_3$  zu erhalten, dann bemühte ich mich durch abwechselnden Gebrauch von wasserfreiem  $\text{CO}_3\text{K}_2$  und der Destillation die Alkohole zu isoliren.

Ein Drittel der Flüssigkeit wurde zur Bestimmung der Fettsäuren benutzt, dabei war das Verfahren dasselbe wie bei den blossen Lösungen von Fleischextract. Das zweite Drittel wurde bis zu Syrupeconsistenz eingedampft, mit  $\text{HCl}$  behandelt und mit Aether ausgezogen. Nach Verdampfung des Aethers erhielt ich die Milchsäure, den Theil der Bernsteinsäure, den der Aether auflösen konnte, und vielleicht

eine Spur von HCl. Durch Einwirkung von frisch niedergeschlagenem AgOH verwandelte ich sie in ihre Silbersalze, trennte dann durch Filtration das bernstein- und salzsaure Silber von dem milchsauren Silber, behandelte letzteres mit  $H_2S$ , filtrirte es und unterwarf es einer langsamen Verdampfung. Wenn aller  $H_2S$  verschwunden ist, setzt man es in das Calciumsalz um, das man krystallisiren lässt und bestimmt. Der Theil der Bernsteinsäure, der als Silbersalz auf dem Filter geblieben ist, wird mit HCl behandelt, filtrirt und der Crystallisation unterworfen.

Nachdem so das zweite Drittel der Flüssigkeit mit Aether ausgezogen war, bestimmte ich das Glycerin und den nicht in den Aetherauszug übergegangenen Theil der Bernsteinsäure, wobei ich mich desselben Verfahrens bediente, das Pasteur bei der Bestimmung des Glycerins und der Bernsteinsäure benutzte, die sich bei Alkoholgährung durch Bierhefe bilden. Man behandelt die Flüssigkeit mit einer Mischung von Alkohol und Aether, filtrirt und dampft ab. Dann wandelt man die Bernsteinsäure in das betreffende Kalksalz um, indem man Kalkwasser bis zur Neutralisation zusetzt. Von Neuem hinzugesetzter Alkohol und Aether löst jetzt nur das Glycerin auf; wird diese Lösung langsam abgedampft und noch die Luftpumpe zu Hülfe genommen, so ergiebt sich die Menge des Glycerins. Welche Vorsichtsmaßregeln man auch treffen mag, die Bestimmung des Glycerins kann immer nur eine annähernde sein. Was das mit Salzen nicht krystallisirbarer Säuren verunreinigte bernsteinsaure Calcium betrifft, so lässt man es 24 Stunden lang mit Alkohol von  $80^\circ$  digeriren, macht dann durch etwas HCl aus dem bernsteinsauren Calcium die Bernsteinsäure frei, dampft ab, löst in etwas Wasser auf und fällt dann das Ca durch einen Strom  $CO_2$ . Man erhält so durch Krystallisiren reine Bernsteinsäure.

Der Niederschlag, der sich auf dem Boden des Gefässes gebildet hat, wird abgeklärt, mit etwas Wasser vermischt und mit HCl behandelt, bis die Reaction freie Säure anzeigt. Dann filtrirt man die Lösung, dampft ein, zieht mit Aether aus und erhält so die Bernsteinsäure, die wie oben zunächst

in das Silbersalz umgewandelt, als Bernsteinsäure bestimmt wird. Der in Aether nicht gelöste Theil wird mit Alkohol behandelt, filtrirt und abgedampft. Durch Zusetzen von essigsaurem Kali hätte ich Oxalsäure auffinden müssen, aber ich konnte nie die geringste Spur davon entdecken.

Die Resultate sind folgende:

Der eine durch einen Wattepfropf verschlossene Kolben wurde am 4. Februar untersucht.

Die trübe neutrale Flüssigkeit ergab bei der mikroskopischen Untersuchung, dass der *Bacillus subtilis* lebte und in der Flüssigkeit umherschwamm, am Boden des Gefässes fanden sich todte Bacillen in grosser Menge.

Ich fand keine Alkohole; doch ist es möglich, dass man sie findet, wenn man grössere Mengen Glycerin in Untersuchung zieht.

Baryumsalze der flüchtigen Fettsäuren 0,818 gr.

Milchsaures Calcium 0,401 gr.  $(C_3 H_5 O_3)_2 Ca + 5 H_2 O$ , also 0,23 gr. Milchsäure.

Von Bernsteinsäure eine Spur im Aetherauszug.

Uebrig gebliebenes Glycerin 4,85 gr.; es hatte ungefähr dieselbe Dichte wie das ursprünglich angewendete, und es waren also 1,27 gr. Glycerin bei der Gährung verbraucht worden.

Der andere mit Wattepfropf verschlossene Ballon wurde am 12. Februar analysirt.

Die mikroskopische Untersuchung ergab dasselbe wie beim ersten Ballon.

Keine Alkohole.

Baryumsalze der flüchtigen Fettsäuren 1,251 gr. Zweimal umkrystallisirt und der Temperatur von  $128^\circ$  ausgesetzt, ergab dies Salz 46,17 % Baryum. Es besteht also hauptsächlich aus buttersaurem Salz, das 44,05 % Baryum verlangt. Wenn die Analyse einen etwas höheren Procentsatz ergibt, als dem reinen buttersauren Salz zukommt, so rührt dies wahrscheinlich daher, dass sich auch essigsaures Baryum gebildet hat.

Milchsaures Calcium 0,48 gr., also 0,28 gr. Milchsäure.  
Von Bernsteinsäure eine Spur.

Glycerin, von etwa derselben Dichte wie das ursprünglich angewendete, 4,57 gr., also war 1,55 gr. verschwunden.

Der dritte Kolben, der nur eine sehr begrenzte Menge Luft enthielt, diente mir besonders zur Bestimmung der gasförmigen Gährungsprodukte, und wurde am 13. März analysirt.

In makroskopischer Hinsicht habe ich nichts zu dem hinzuzufügen, was Cohn beim Einschliessen desselben Bacillus in zugeschmolzene Kolben beobachtet hat<sup>1)</sup>. Die trübe Flüssigkeit zeigt auf der Oberfläche ein sehr dünnes und zartes Häutchen, das fetter und glänzender aussieht wie dasjenige, das sich bildet, wenn der Kolben nur durch einen Wattepfropf verschlossen ist. Doch muss ich hier bemerken, dass bei längerer Ausdehnung des Versuchs das Häutchen zuletzt auf den Boden des Gefässes fällt und die Oberfläche der Flüssigkeit frei bleibt. Mikroskopisch erwies sich der Bacillus subtilis noch vollständig am Leben, doch hatte er eine Modifikation erlitten; die Stäbchen waren dünner und schlanker geworden, auch die Sporen hatten sich verkleinert. Diese Veränderung liess sich nicht als Auftreten eines anderen Microorganismus in der Flüssigkeit erklären, denn abgesehen davon, dass ich alle möglichen Vorsichtsmassregeln zum Erzielen einer reinen Cultur angewendet hatte, konnte ich dem Bacillus auch seine frühere mikroskopische Beschaffenheit zurückgeben, wenn ich ihn in eine neue Nährflüssigkeit brachte, die nur Fleischextrakt enthielt, und sich in fest mit einem Wattepfropf verschlossenen Kolben befand. Uebrigens wissen wir aus der Arbeit Buchner's<sup>2)</sup>, dass man die Form des Bacillus durch blosse Abänderungen der chemischen Zusammensetzung der Nährflüssigkeit, in der er gezüchtet wird, modificiren kann.

1) Beiträge zur Biologie der Pflanzen, Bd. II, H. 2, S. 272. 1876.

2) Beiträge zur Morphologie der Spaltpilze. Untersuchungen über niedere Pilze. Nägeli, S. 209.

Bei der chemischen Analyse der Flüssigkeit erhielt ich:  
Baryumsalze der flüchtigen Fettsäuren 3,714 gr. Zweimal umkrystallisirt und einige Zeit hindurch der Temperatur von  $128^{\circ}$  ausgesetzt, ergab dies Salz 45,32% Baryum, muss also wesentlich aus buttersaurem Salz bestehen.

Milchsaures Calcium 1,578 gr., also 0,92 gr. Milchsäure.  
Bernsteinsäure 0,087 gr.

Das nicht assimilirte Glycerin wurde hier mit grösster Sorgfalt bestimmt, es betrug 2,41 gr. Da nun das benutzte Glycerin eine Dichte zwischen 1,22 und 1,23 hatte, also etwa 85% reines wasserfreies Glycerin enthielt, da es andererseits unmöglich ist, das Glycerin von allen Verunreinigungen durch Extractivstoffe befreit zu bestimmen, kann man annehmen, dass etwa 3 gr. Glycerin zur Gährung verwendet worden waren.

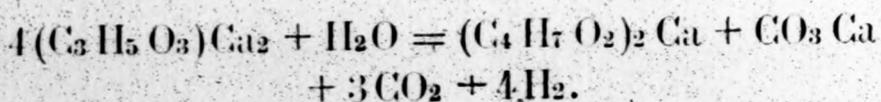
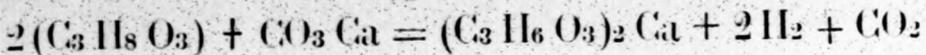
Die Gasanalyse wurde gemacht, sobald sich gasförmige Gährungsprodukte bildeten; von dieser Zeit an bemerkte man auch, dass das Bacillenhäutchen nicht mehr an Dicke zunahm.

Die Ergebnisse sind folgende:

Analyse am 6. Februar:	Analyse am 20. Februar:
$\text{CO}_2$ . . . . = 22,52	$\text{CO}_2$ . . . . = 37,02
$\text{H}_2$ . . . . = 15,35	$\text{H}_2$ . . . . = 3,72
$\text{N}_2$ + Fehler = 62,13	$\text{N}_2$ + Fehler = 59,26

Später erhielt ich nur noch  $\text{CO}_2$ .

Nun muss die Umsetzung des Glycerins in milchsaures Calcium und die des milchsauren Calciums in buttersaures Calcium nach der Formel geschehen<sup>1)</sup>:



Wenn man berücksichtigt, dass der Bacillus in der ersten Zeit seiner Entwicklung und Vermehrung den ganzen Sauerstoff der im Kolben eingeschlossenen Luft durch  $\text{CO}_2$

<sup>1)</sup> Hoppe-Seyler: Archiv für die gesammte Physiologie, Bd. 12 S. 8 u. 9. — Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. II, S. 1.

ersetzt hat, und wenn man nach den 62,13 N<sub>2</sub> den Procentgehalt der untersuchten Luft an CO<sub>2</sub> berechnet, und ihm von den 22,52% CO<sub>2</sub> abzieht, so findet man, dass sich in der ersten Zeit der Gährung sicher zweimal mehr H<sub>2</sub> als CO<sub>2</sub> gebildet hat. Später vermindert sich H<sub>2</sub> und nimmt CO<sub>2</sub> an Menge zu, und von einem gewissen Zeitpunkt an findet man kein H<sub>2</sub> mehr. Es kommt dies von dem grossen Reduktionsvermögen, das H<sub>2</sub> besitzt<sup>1)</sup>, auf diese Weise entsteht die Bernsteinsäure und wahrscheinlich auch Reduktionsprodukte von stickstoffhaltigen Körpern im Fleischextrakt.

Ohne auf die grosse Aehnlichkeit näher einzugehen, die zwischen der Gährung und der Einwirkung der Aetzalkalien besteht, und die besonders von Hoppe-Seyler in den oben citirten Arbeiten hervorgehoben wurde, will ich nur bemerken, dass die Einwirkung des *Bacillus subtilis* auf Glycerin ganz identisch mit der ist, die Dumas und Stas<sup>2)</sup> und ferner E. Herter<sup>3)</sup> für KOH erhalten haben. Die beiden ersten Autoren erhielten Essigsäure und Ameisensäure, später zeigte E. Herter, dass sich Buttersäure und Milchsäure bilden. Auf Grund der von Hoppe-Seyler erhaltenen Resultate<sup>4)</sup> betrachtet er die Buttersäure als ein secundäres Produkt der Einwirkung von KOH auf die Milchsäure.

#### **Gährungsprodukte, die durch den *Bacillus subtilis* auf Kosten des Traubenzuckers entstehen.**

Ein Kolben mit 10 gr. Traubenzucker und 2½ gr. Fleischextract auf 700 ccm. Wasser, durch einen Wappfropf verschlossen, wurde am 11. Januar in Untersuchung gezogen, die bei 36° geschah. Auch hier versetzte ich die Flüssigkeit unmittelbar nach dem Kochen mit CO<sub>2</sub> Ca, das vorher einer Temperatur von 200° ausgesetzt gewesen war.

Der Gang der Untersuchung war derselbe wie beim Glycerin, die Bestimmung des Traubenzuckers geschah durch Fehling'sche Lösung.

1) Hoppe-Seyler: Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. II, S. 25.

2) Annales de chimie et de physique, t. 73, p. 148.

3) Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. II, S. 1167.

4) Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. II, S. 14.

Der Inhalt des Kolbens wurde am 1. März analysirt.

Bei mikroskopischer Untersuchung zeigte sich der Bacillus vollständig lebend.

Durch Gährung nicht zerlegter Traubenzucker 2,81 gr.  
Baryumsalze flüchtiger Fettsäuren 0,624

Milchsaures Calcium 1,21, also 0,70 Milchsäure.

Keine Bernstein- und Oxalsäure.

Eine Bestimmung von Mannit geschah hier nicht.

Ein anderer Kolben von 800 ccm Inhalt mit derselben Flüssigkeit, also 10 gr. Traubenzucker,  $2\frac{1}{2}$  gr. Fleischextract und  $\text{CO}_3\text{Ca}$  auf 700 ccm. Wasser wurde, wie bei der Glycerinlösung, mit Kautschukstopfen und Glasröhre versehen und diente besonders zur Gasanalyse. Die Züchtung geschah hier in Gegenwart einer begrenzten Menge Luft, der Versuch begann am 26. Januar, die Analyse wurde am 10. März vorgenommen.

Makroskopisch bestanden keine grossen Unterschiede zwischen dieser Kultur und derjenigen, die unter denselben Bedingungen mit Glycerin gemacht wurde.

Mikroskopisch zeigte der Bacillus subtilis dieselbe Modifikation, wie sie beim Glycerin beobachtet worden war: Die Sporen waren kleiner, hatten aber dieselbe Grösse wie beim Glycerin, die Stäbchen waren auch schlanker, hatten aber grössere Neigung, vereinigt zu bleiben und ziemlich lange Fäden von langsamer Bewegung zu bilden. Ferner beobachtete ich, dass ebenso wie beim Glycerin die Sporen im Verhältniss zu den Stäbchen weniger zahlreich waren als bei den Kulturen, die auf Fleischextract in mit Watte verschlossenen Kolben gezüchtet waren. Dies war alles, was ich mit der Vergrösserung, über die ich verfügte, beobachten konnte. Auch hier konnte ich dem veränderten Bacillus seine ursprüngliche Form wiedergeben, wenn ich ihn bei Gegenwart von Luft in einer Lösung von Fleischextract züchtete.

Die Resultate der Analyse sind folgende:

Es hatten sich hier sicher zwei Alkohole gebildet, von denen der eine bei einer Temperatur von unter  $100^\circ$ , der

andere bei über  $100^{\circ}$  überdestillirte. Indessen konnte ihre Menge nicht gross sein, denn es gelang mir nur 0,812 zu isoliren, und in ihrer Mischung war noch Wasser enthalten. Ich gedenke sie noch später zu studiren.

Baryumsalze flüchtiger Fettsäuren 0,828.

Zweimal unkrystallisirt und auf einer Temperatur von  $128^{\circ}$  erhalten, ergab dies Salz 42,71% Baryum, es muss also hauptsächlich aus Buttersäure bestehen, und wenn die Zahl 44,05, die der Procentgehalt des buttersauren Baryums an Baryum angibt, nicht erreicht wird, so kommt dies wahrscheinlich von einer Beimischung von Capronsäure:

Milchsaures Calcium 6,99, also 4,08 Milchsäure.

Mannit, durch siedenden Alkohol ausgezogen, 5,1-gr.

Von Bernsteinsäure eine Spur, etwa 0,01.

Von Traubenzucker keine Spur mehr.

Gasanalyse (ich konnte hier keine Gasanalyse am Anfang der Gährung machen, der erste Theil der sich bildenden Gase ist also nicht analysirt worden).

Analyse vom 13. Februar:

CO<sub>2</sub> . . . . = 78,61

H<sub>2</sub> . . . . = 3,39

N<sub>2</sub> + Fehler . = 18,00

Später erhielt ich nur noch CO<sub>2</sub>, ausgenommen ganz zuletzt, denn die letzte Analyse, die ich aufstellte, ergab eine Spur von H<sub>2</sub>. Es ist mehr als wahrscheinlich, dass die Analyse wachsende Quantitäten von H<sub>2</sub> ergeben hätte, wenn ich den Versuch weiter fortgesetzt hätte. Denn legen wir uns Rechnung von der Art und Weise ab, wie die Gährung vor sich gehen musste, so sehen wir, dass H<sub>2</sub> nur aus der Umsetzung von Milchsäure in Buttersäure entstehen konnte, da bei der Entstehung der Milchsäure aus Traubenzucker kein H<sub>2</sub> gebildet wird. Da sich der bei der Gährung entstehende H<sub>2</sub> durch sein grosses Reduktionsvermögen auszeichnet, so müssen durch seine Einwirkung auf die Lösung von Traubenzucker Reduktionsprodukte entstehen, und so erklärt sich ein Theil des Mannits. Ich sage ein Theil, denn augenscheinlich giebt die geringe Menge fester Säuren, die

sich bildet, keine Erklärung für das Entstehen einer so grossen Menge von Mannit. Ich muss also annehmen, dass der Mannit wenigstens theilweise ein direktes Gährungsprodukt ist. Wir sehen, dass später, wenn kein Traubenzucker mehr in der Lösung vorhanden ist,  $H_2$  wieder erscheint und dass dann auch andere Produkte, wie die Bernsteinsäure, auftreten.

Ich habe auch begonnen, die chemische Zusammensetzung des *Bacillus subtilis* zu untersuchen; da ich indessen diesen Gegenstand in einer besonderen Arbeit zu behandeln gedenke, will ich hier nur erwähnen, dass ich das Vorhandensein von Nuclein nachweisen konnte, während ich keine Cellulose auffand. Ich behandelte den *Bacillus* bei  $100^\circ$  mit Lösungen 1, 2, 3%  $H_2SO_4$ , ich setzte ihn sogar eine sehr kurze Zeit lang im Wasserdampf reiner Schwefelsäure aus, erhielt aber nie die geringste Reaktion mit Fehling'scher Lösung.

#### Schlussfolgerung.

Der *Bacillus subtilis* kann ziemlich lange als Ferment leben, und wenn die Ergebnisse Buchner's sich bestätigen, so ist die Umwandlung des *Bacillus anthracis* in *Bacillus subtilis* der Uebergang eines Wesens, das nur sehr kurze Zeit ohne freien Sauerstoff leben kann, in ein Wesen, das sehr wohl ziemlich lange die ihm zum Leben nöthige Wärme durch Zerlegung gährungsfähiger Substanzen bilden kann<sup>1)</sup>. Der *Bacillus subtilis* wandelt die Kohlehydrate zunächst in Milchsäure um, und hat eine grosse Neigung auf Kosten der letzteren Buttersäure zu bilden.

Schliesslich sei es mir gestattet, Hrn. Prof. Dr. Hoppe-Seyler für seine mir stets in liebenswürdigster Weise gewordenen Rathschläge meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

1) Denn zu der Zeit, da ich die Nährflüssigkeiten der Kulturen in geschlossenen Gefässen untersuchte, fand die Bildung gasförmiger Gährungsprodukte noch statt, hatte aber sehr abgenommen.