

Ueber den Einfluss des Sauerstoffs auf Gährungen.

Von

Eduard Buchner in München.

(Der Redaktion zugegangen am 9. Februar 1885.)

Die Beziehung des Sauerstoffs zum Gährvorgang verdient sowohl in chemischer Hinsicht, als insbesondere vom physiologischen Standpunkt aus, grosses Interesse.

Wie bekannt stellte Pasteur 1861 als Resultat seiner Untersuchungen eine Theorie auf, welche man etwa dahin zusammenfassen kann: Die gährfähigen Pilze vermögen den zu ihrem Leben nöthigen Sauerstoff leichter zersetzbaren Verbindungen zu entziehen und bringen dieselben dadurch zum Zerfall, jedoch nur bei Abwesenheit freien Sauerstoffs. Die experimentelle Grundlage dieses Satzes wurde von Schützenberger angegriffen; ebenso führte Nägeli schwerwiegende Bedenken dagegen auf.

Auch in einer neueren Publikation vom Jahre 1876¹⁾ bleibt Pasteur auf dem früheren Standpunkt und veröffentlicht weitere Versuche, welche für seine Anschauungen beweisend sein sollen. Bei genauer Durchsicht müssen jedoch auch hier die Schlussfolgerungen als sehr fragwürdig erscheinen.

Kritik der Pasteur'schen Versuche.

Zuerst werden einige wenige Experimente über die Wirkung der Luft auf Sprosshefe angeführt. Ich habe die Resultate derselben der grösseren Uebersichtlichkeit halber

¹⁾ Études sur la bière. Paris 1876.

in der folgenden, kleinen Tabelle zusammengestellt; die Reihenfolge ist nach der Stärke der Luftwirkung gewählt, so dass Versuch (1) nahezu bei gänzlichem Sauerstoffmangel, (5) und (6) dagegen bei starkem Luftzutritt stattfanden. Die Beschaffenheit der Nährlösung bei (1) ist nicht angegeben und die eingesetzte Zahl nur als wahrscheinlich zu betrachten. Versuch (5) und (6) unterscheiden sich dadurch, dass bei (6) in Folge der geringen Versuchsdauer der anfänglich gelöste Sauerstoff mehr in Betracht kommt, als bei (5).

Pasteur's Versuche mit Sprosshefe.

Versuchs-Nr.	Études sur la Bière.		Nähr- lösung.	Dauer des Versuches (t)	Zu- gegebener Zucker		Ver- gohrener Zucker (z)	Hefemenge am Schlusse (y)	Verhältniss zwischen Hefe und ver- gohreinem Zucker $\frac{y}{z}$
	pag.	Sucré candi			gr.	gr.			
(1)	241	5 ‰ (?)	5 ‰ (?)	3 Monate	150 (?)	45	0,255	$\frac{1}{176}$	
(2)	236	5 ‰	5 ‰	20 Tage	150	145,4	1,368	$\frac{1}{89}$	
(3)	236	5 ‰	5 ‰	10 ‰	150	150	1,970	$\frac{1}{76}$	
(4)	242	5 ‰	5 ‰	2 ‰	10	10	0,44	$\frac{1}{22,7}$	
(5)	243	0,9 ‰	0,9 ‰	2 ‰	1,72	1,04	0,127	$\frac{1}{8,1}$	
(6)	243	0,9 ‰	0,9 ‰	1 ‰	1,72	0,098	0,024	$\frac{1}{4}$	

Pasteur vergleicht nun die Verhältnisszahlen zwischen Hefe und vergohrenem Zucker, $\frac{y}{z}$, welche er «le pouvoir du ferment» nennt, direkt und glaubt daher Beweise zu seiner Theorie erhalten zu haben.

Es ist schwer einzusehen, von welchen Vorstellungen ausgehend sich Pasteur gegen die Einwände Schützenberger's taub zeigen konnte. Ganz unerlässlich ist es nämlich, auf die Dauer der Hefenwirkung Rücksicht zu nehmen; es kann doch nie gleichgiltig sein, ob eine gewisse Menge gährtüchtiger Hefe einen oder zwei Tage auf Zucker einwirkt. Sollte es dafür noch experimenteller Beweise bedürfen, so sind dieselben bereits erbracht und werde ich gelegentlich darauf hinweisen. Das einzig richtige Mass für die Stärke der Gährwirkung ist die Menge des vergohrenen Zuckers, dividirt durch das Produkt aus Hefengewicht mal

Zeit, also $\frac{y}{z \cdot t}$ in unserem Falle. Hierbei wird noch vorausgesetzt, dass die Hefenaussaat im Verhältniss zur Hefenmenge am Schlusse des Versuches jedesmal verschwindend klein sei und dass ferner die Entwicklung der Hefe während der ganzen Versuchsdauer gleichmässig verlaufe. Versuch (1) ist aus dem letzterwähnten Grunde mit den übrigen absolut unvergleichbar; ausserdem muss noch sogar angenommen werden, dass in diesem Versuche ein gut Theil der früher gebildeten Hefezellen in Folge Involutionerscheinungen zerstört wurde, wodurch die schliesslich zur Abwägung gelangte Hefenmenge jedes Anhaltspunktes für die wirklich in Thätigkeit gewesene Pilzmasse verlustig wird, denn wie Pasteur angiebt, mussten bei Unterbrechung dieses Versuches alle Zellen für «des cellules monstres» gehalten werden. Die Versuche (5) und (6) dagegen lassen sich mit den übrigen in keiner Weise vergleichen, da wir es hier mit einer 0,9procentigen Zuckerlösung, sonst aber mit einer 5procentigen zu thun haben. Berechnen wir für (2), (3) und (4) die Zahl

$\frac{y}{z \cdot t}$, so erhalten wir $\frac{1}{4,5}$, $\frac{1}{7,6}$, $\frac{1}{10,4}$ oder gerade

das Gegentheil von dem, was Pasteur finden wollte. Solche Versuche dürfen übrigens in keiner Weise als überzeugend betrachtet werden; denn abgesehen davon, dass die Culturen gegen das Aufkommen von Spaltpilzen nicht geschützt waren, hat Pasteur auch verschiedene Sprosshefeformen angewendet. So bei Versuch (2) und (3) *Saccharomyces pastorianus*, bei (5) und (6) obergährige Bierhefe; über die Aussaaten bei (1) und (4) verlautet gar nichts. Eine Angabe über die Temperatur bei den Gährungen findet sich auch nur für (2) und (3).

Jedenfalls können die Versuche Pasteur's mit Sprosshefe nicht als Beweis für die Sauerstoffentziehungstheorie gelten.

Ueber den Einfluss des Sauerstoffs auf Spaltpilzgährungen führt Pasteur einige spärliche Experimente an, die ihre Resultate nur dem mikroskopischen Befunde zu entnehmen scheinen. Beim ersten derselben wurde eine Lösung von milchsaurem Kalk und anorganischen Nährsalzen mit einer zufällig erhaltenen Pilzcultur, die hauptsächlich Buttersäurebakterien enthielt, inficirt. Nach drei Wochen war der Höhepunkt der Gährung erreicht. Nun wurden $2\frac{1}{2}$ Liter der Lösung mit 50 cc. Luft alle 10 Minuten während einer Stunde geschüttelt. Eine mikroskopische Untersuchung ergab, dass die Bewegung der Vibrionen sehr abgeschwächt war. Die Gährung zeigte sich vermindert, ohne gänzlich aufgehoben zu sein, «zweifellos, weil nicht alle Theile der Lösung mit dem Sauerstoff der Luft in Berührung gekommen waren.» Leider fehlt eine Angabe, wodurch sich die Verminderung der Gährung kundgegeben haben soll. Aus den folgenden Versuchen ist zu schliessen, dass Pasteur die Abschwächung der Bewegungen der Spaltpilze allein schon als Zeugniß dafür ansieht. Jedenfalls ist zu berücksichtigen, dass durch das häufige Schütteln der Nährlösung, wohl verbunden mit einer Herausnahme aus dem Brütöfen, eine nicht unbeträchtliche Herabminderung der Temperatur und damit eine wesentliche Verschlechterung der Bedingungen für das Wohlbefinden der Organismen gegeben war. Ein zweiter Versuch wurde

mit zwei «tubes d'essai» ausgeführt, welche zur Hälfte mit einer in gleicher Weise auf den Höhepunkt der Intensität gekommenen gährenden Flüssigkeit einer «anderen Gährung» gefüllt waren. In das eine Gefäss wurde nun ein Luftstrom eingeleitet, in das andere ein Kohlensäurestrom. «Nach Verlauf einer halben Stunde waren in dem Versuche mit Luft alle Vibrionen todt, zum wenigsten ohne Bewegung und die Gährung erholte sich nicht mehr; in dem Versuche mit Kohlensäure dagegen waren nach 3 stündiger Einwirkung die Vibrionen sehr lebhaft und die Gährung dauerte fort. Pasteur unterlässt jede Angabe, was das für eine «andere Gährung» war; ebenso ist keine Andeutung darüber vorhanden, wodurch auf die völlige Unterdrückung der Gährung in dem einen, auf die Fortdauer in dem anderen Fall geschlossen wurde. Davon dass die Spaltpilze durch den Luft-einfluss getödtet wurden, kann gewiss keine Rede sein, sie waren höchstens ohne Bewegung. Es ist aber eine Annahme, die jeder Begründung entbehrt, wenn man glaubt, von der mehr oder minder grossen Eigenbewegung der Spaltpilze direkt auf deren Gährvermögen schliessen zu können. Denn es giebt nicht nur Bacterien, welche unter vielen Bedingungen lebhaftere Bewegungsfähigkeit zeigen, ohne jemals als Gährungs-erreger angetroffen worden zu sein — ich erinnere an *Bacillus subtilis*, wir kommen später darauf zurück — sondern wir kennen andererseits auch Spaltpilze, welche eine äusserst kräftige Gährwirkung mit ganz geringer Eigenbewegung verbinden (z. B. *Bacterium Fitz.*). Wie sehr übrigens die Pasteur-schen Angaben über die Bewegungsfähigkeit der Spaltpilze mit Vorsicht aufzunehmen sind, beweisen seine weiteren Auseinandersetzungen «über den tödtlichen Einfluss der atmosphärischen Luft auf die Vibrionen». Eine gährende Flüssigkeit wurde, ohne mit Luft in Berührung gekommen zu sein, durch den Druck ihrer eigenen Kohlensäureentwicklung in eine flache Glaszelle getrieben; unter dem Mikroskop waren die Bewegungen der Vibrionen sehr deutlich zu bemerken. Wurde dagegen auf die gewöhnliche Weise ein Tropfen derselben Lösung unter einem Deckgläschen unter-

sucht, so war ein erstaunlicher Unterschied in der Stärke der Bewegungen gegenüber dem vorigen Versuche vorhanden. Ja noch mehr, man sah sogar am Rande des Tropfens unter dem Deckgläschen, also bei direktem Einfluss der Luft, alle Bewegungen aufhören, während sie in der Mitte der Flüssigkeit um so länger erhalten blieben, je mehr Vibrionen am Rande vorhanden waren, um den eindringenden Sauerstoff zu absorbieren. Man benöthigt ferner keine grosse Geschicklichkeit im Beobachten, um deutlich zu erkennen, dass in den ersten Augenblicken, nachdem das Deckgläschen mit dem Tropfen auf den Objektträger gebracht worden, nachdem also die ganze Flüssigkeit mit der Luft in Berührung kam, alle Vibrionen entkräftet, gewissermassen krank sind, dass sie nach und nach gegen den Mittelpunkt hin wieder beweglicher werden, im Verhältniss wie sie in Theile der Nährlösung kommen, die weniger Sauerstoff enthalten. So weit Pasteur.

Obwohl nun, wie schon erwähnt, von einem schädigenden Einfluss auf die Bewegungsfähigkeit kein direkter Schluss auf das Gährvermögen oder auf das Gesamtwohlbefinden oder gar auf Tod oder Leben gestattet werden kann, so schien eine experimentelle Prüfung der auffälligen Ergebnisse Pasteur's doch sehr wünschenswerth. Eine Angabe über die Spaltpilze, mit welchen diese Versuche ausgeführt wurden, fehlt; als Nährmaterial benutzte Pasteur anorganische Salze. In meinen Versuchen verwandte ich Reinculturen des *Butylbacillus*, der aller Wahrscheinlichkeit nach mit dem *Vibrio butyrique* identisch ist, und daher nach Pasteur's 1. Versuch sehr geeignet zu diesen Experimenten erschien. Die Culturen in sterilisirter Nährlösung von 5% Glycerin, 2% Fleischextrakt mit Zugabe von 5% Calciumcarbonat waren bereits 24 Stunden nach der Aussaat auf dem Höhepunkt der Gährung angelangt. Die Bewegungen der Stäbchen und Fäden in der Glaszelle bei Luftabschluss erwiesen sich unter dem Mikroskop als äusserst kräftig. Aber auch unter dem Deckglas zeigten sich die Pilze sehr beweglich, bis hinaus an den Rand des Tröpfchens, mit einziger Ausnahme, dass

einzelne Stäbchen, besonders längere, wie festgekeilt lagen, während dagegen andere, besonders kürzere, sich lustig um dieselben herumtummelten und sogar zwischen ihnen und dem Flüssigkeitsrande durchschlüpfen. Bringt man absichtlich Luftblasen unter das Deckgläschen, so kann man die Bewegungen der Bakterien in den schmalen Wasserstrassen zwischen denselben verfolgen; hier muss doch die Lösung baldigst mit Luft gesättigt sein, trotzdem konnte ich keine Abnahme der Beweglichkeit constatiren. Bringt man einen Tropfen der Gährflüssigkeit an einem Deckgläschen hängend in den Hohlraum eines hohlgeschliffenen Objektträgers, so müsste die Einwirkung der Luft jedenfalls sehr bald, besonders am Rande des Tropfens, wo die Flüssigkeitsschicht dünn ist, hemmend auf die Bewegungsfähigkeit einwirken. Ich habe diesen Versuch Dutzende von Malen ausgeführt, ohne eine solche Beobachtung machen zu können. Dagegen tritt die charakteristische Randschicht bewegungsloser Pilze immer dann auf, wenn in Folge Temperaturdifferenzen der Tropfen rasch verdampft; der äusserste Rand der Flüssigkeit zieht sich dabei sprungweise zurück und nimmt die in den verdampfenden Regionen befindlichen Pilze mit sich; dieselben sammeln sich in grösserer Zahl an und verlieren in Folge zu hoher Concentration der Nährlösung an diesem Punkte oder vielleicht auch in Folge physikalischer Anziehungskräfte ihre Beweglichkeit.

Ein weiterer Versuch sollte dem zweiten von Pasteur ähnlich gestaltet werden. Von einer Reincultur des *Butylbacillus* (Nährlösung: 5% Glycerin, 2% Fleischextrakt mit Zusatz von 5% kohlensaurem Kalk), die sich bereits in starker Gährung befand, wurden ungefähr 20 cc. in sterilisirte Kolben von 300 cc. Inhalt gesaugt; hierbei war eine Verunreinigung durch fremde Pilze ausgeschlossen. Die Einrichtung der Kolben war so ziemlich die gleiche, wie sie bei meinen später zu erwähnenden Versuchen mit *Bacterium Fitz.* in Anwendung kam und dort beschrieben werden wird. Diese Kolben nun, in denen die Flüssigkeit nur eine 1 cm. hohe Schicht bildete, kamen in den Brütkasten und zugleich

in den Schüttelapparat zu stehen; in den einen wurde in starkem Strome Sauerstoff, in den anderen Kohlendioxyd eingeleitet und gleichzeitig durch Schütteln die Flüssigkeiten fortwährend in Bewegung erhalten. Das Zuleitungsrohr reichte in beiden Kolben bis auf den Boden, so dass die Gase in Blasen aufstiegen; der Austritt der Gase aus den Kolben erfolgte durch eine fein zugespitzte Glasröhre, in Folge dessen herrschte immer starker Luftstrom nach aussen; beide Glasröhren waren mit doppeltdurchbohrten Stopfen luftdicht in die Kolben eingesetzt. Nach 35 Minuten, nach $2\frac{1}{2}$ Stunden, nach 8 Stunden wurden Proben der Culturen entnommen und mikroskopisch untersucht; es zeigte sich nirgends eine Abnahme der Beweglichkeit, selbst ganz lange Fadenformen waren in Bewegung. Auch nach 24 Stunden, als der Versuch unterbrochen wurde, zeigte sich kein anderes Resultat. Es waren gegen 7 Liter Sauerstoff eingeleitet worden. Die mikroskopische Untersuchung ergab keine Aenderung im Aussehen der Culturen; es wurden gefärbte Präparate davon angefertigt. Ferner machte ich von den Gährflüssigkeiten, sowohl der mit Sauerstoff-, als der mit Kohlensäureeinleitung eine Aussaat in je ein Gläschen mit sterilisirter Glycerin-Fleischextraktnährlösung. In beiden Fällen trat wie gewöhnlich lebhaft Gährung ein.

Wenn wir also die Pasteur'schen Angaben über den Einfluss des Sauerstoffs auf Spaltpilzgährungen mit diesen Resultaten vergleichen, so erscheint die Deutung seiner Beobachtungen als nicht unzulässig.

Versuche von Pedersen, Nägeli, Hoppe-Seyler und Fitz.

Nachdem die Frage über den Einfluss des Sauerstoffs auf Gährungen durch Pasteur in Fluss gekommen war, wurde sie nun auf alle mögliche Weise ventilirt und die verschiedensten Versuche angestellt.

Einen hervorragenden Rang unter den letzteren nehmen die Arbeiten R. Pedersen's über die untergährige Bierhefe

ein¹⁾. Derselbe bewies durch eine Anzahl von Experimenten den fördernden Einfluss der atmosphärischen Luft auf die Vermehrung der Hefe sowohl, als auf die Bildung von flüchtigen Produkten; wurde dagegen die entstandene Menge flüchtiger Körper auf die Gewichtseinheit Sprosshefe berechnet, so ergaben sich bei Luftzufuhr geringere Zahlen als bei Luftabschluss. Und zwar trotzdem Pedersen als mittlere wirksame Hefemenge einfach das arithmetische Mittel zwischen den Gewichten der Hefe am Anfang und am Ende jedes Versuches annahm; die Versuche zeigen aber gerade, dass in den Culturen mit Luft am Anfang eine ausserordentliche Pilzvermehrung stattfindet, die bald sehr abnimmt, während in den Culturen ohne Luft die Pilzentwicklung viel gleichmässiger erfolgt. In Wirklichkeit ist also unter diesen Bedingungen, wenn die Vermehrung der Hefe nicht ausgeschlossen ist, die Gährthätigkeit der einzelnen Zelle bei starkem Luftzutritt noch geringer als sie die Resultate von Pedersen erscheinen lassen²⁾.

Im Jahre 1879 stellte Nägeli wie bekannt eine neue Gährtheorie auf³⁾; bezüglich der Einwirkung des Sauerstoffs formulirte er seine Ansicht dahin, dass der freie Sauerstoff bei hinreichender Gährthätigkeit zum Leben der Pilze einerseits entbehrlich sei, andererseits aber die Gegenwart desselben förderlich auf die Gährthätigkeit der Pilze einwirke. Zur Entkräftung der Pasteur'schen Anschauungen wird zunächst auf die Essigätherbildung bei der Alkoholgährung des Zuckers hingewiesen. Wie theoretisch bereits zu ver-

1) Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet. Kopenhagen 1878. Résumé. Vergleiche auch die schönen, bestätigenden Versuche von Hansen, Meddelelser etc. 1879. Résumé. S. 88.

2) Bei drei Versuchen (Nr. 3, 4, 5), die unter sonst gleichen Umständen verschieden lang in Gährung belassen wurden, fanden sich bei der Unterbrechung wohl durch zufällige Umstände veranlasst, beinahe gleiche Hefemengen gebildet, wogegen die Quantität der flüchtigen Produkte ziemlich genau den Zeiten, durch welche die Gährungen dauerten, entsprechen. Wir haben hier also den experimentellen Nachweis der Unrichtigkeit von Pasteur's Anschauung, die Zeitdauer der Gährwirkung sei gleichgültig.

3) Theorie der Gährung. München 1879.

muthen, erfolgt dieselbe immer dann, wenn Alkohol und Essigbildung räumlich an demselben Punkte stattfinden, wenn also die noch ungesättigten Radikale auf einander treffen. Praktisch erhält man in der That den meisten Essigäther, wenn Most in sehr dünner Schicht der Einwirkung der Luft ausgesetzt wird. Es kann dann überall in der Flüssigkeit der bereits entstandene Alkohol durch Spaltpilze zu Essigsäure oxydirt werden, da überall der hierzu nöthige freie Sauerstoff vorhanden ist; gleichzeitig wird unbeirrt durch die Gegenwart des letzteren von der Sprosshefe fortgesetzt neuer Zucker zu Alkohol vergohren. Die beiden Vorgänge finden in unmittelbarer Nähe statt, wir erhalten viel Essigäther.

Ferner beschreibt Nägeli fünf direkte Doppelversuche über die Einwirkung des Sauerstoffs, die mit Sprosshefe bei Ausschluss der Vermehrung derselben durchgeführt wurden. Es kamen einfach Rohrzuckerlösungen ohne Zugabe von weiteren Nährstoffen zur Verwendung; bei sonst gleichen Bedingungen wurde in jedem Doppelversuche in einem Fall der Luftzutritt begünstigt, im anderen vermindert oder gänzlich vermieden. Die Resultate stimmen alle darin überein, dass die mit Sauerstoff gährende Hefe bei Ausschluss der Vermehrung bei Weitem die gährtüchtigere ist.

Im Jahre 1881 erschien eine Abhandlung von Hoppe-Seyler über die Einwirkung des Sauerstoffs auf Gährungen¹⁾. Der erste darin beschriebene Versuch ist mit Bierhefe ausgeführt. Durch die Anordnung desselben vermochte der freie Sauerstoff jedenfalls sehr vollkommen einzuwirken; dagegen war keine Vorsichtsmaßregel getroffen, um das Ueberwuchern von Spaltpilzen zu verhindern und so ergab schon die mikroskopische Untersuchung einen in dieser Hinsicht sehr bedenklichen Befund. Auch die enorme Bildung von flüchtiger Säure gerade bei Portion I (mit stärkster Sauerstoffeinwirkung) weist auf die Thätigkeit von Spaltpilzen hin, welche einen Theil des entstandenen Alkohols bereits wieder zu Essigsäure verbrannt hatten. Bei der nor-

¹⁾ Festschrift, Strassburg 1881.

malen Alkoholgährung durch Sprosshefe entstehen bekanntlich etwa 50% Alkohol, bezogen auf das Gewicht des vergohrenen Rohrzuckers; beim vorliegenden Versuch fanden sich bei Portion I nur 17,2%, bei Portion II 19,2%, bei Portion III 31,3% des vergohrenen Zuckergewichtes als Alkohol wieder. Bei Portion III, Nährlösung ruhend in einer Flasche mit Gährröhre, hätten jedenfalls die normalen Verhältnisse eintreten müssen; aber auch hier zeigt sich die wesentliche Modification durch die Thätigkeit von Spaltpilzen. Weitere Versuche Hoppe-Seyler's sind mit verschiedenen thierischen Flüssigkeiten und den von vorneherein darin enthaltenen oder aus der Luft hineingerathenen Organismen angestellt und sollten nur zur Orientirung auf dem noch unerforschten Gebiete dienen. Die Versuche mit Eiweisslösungen ergaben eine um so stärkere Zersetzung, je mehr Luft eingewirkt hatte. Ferner zeigte sich, dass auch bei sehr reichlichem Vorhandensein von freiem Sauerstoff Entwicklung von sich lebhaft bewegenden Bacterien erfolgen kann.

Bei im verflossenen Jahr publicirten Versuchen fand Hoppe-Seyler¹⁾, dass sich in thierischen Flüssigkeiten bei Sauerstoffzutritt mehr Spaltpilze bilden, als ohne solchen. Für Sprosshefe wurde dasselbe Verhältniss sogar zahlenmässig durch Bestimmung der Trockengewichte der entstandenen Hefe festgestellt.

A. Fitz hat in neuerer Zeit einige Beobachtungen über schädliche Einwirkungen auf die Gährthätigkeit von Spaltpilzen veröffentlicht²⁾. So richtig nun seine Angaben über den hindernden Einfluss erhöhter Temperaturen sind (übrigens hat darauf Nägeli bereits 1877 hingewiesen), so fraglich erscheinen die Resultate über die Sauerstoffwirkung. Fitz hat eine einzige oder nur wenige Zellen in verhältnissmässig viel Kulturflüssigkeit ausgesät und dabei eine beträchtliche Verminderung oder ein gänzlich Aufhören der Gährthätigkeit gefunden. Ich kann diese Angaben bezüglich des Butyl-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. VIII, S. 214.

²⁾ Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. XV, S. 877. Bd. XVI, S. 847.

bacillus vollkommen bestätigen. Dieselben verlangen aber eine andere Deutung, sie können nicht durch den Einfluss des freien Sauerstoffs erklärt werden. Bei fortgesetzter Umzüchtung des Butylbacillus in Glycerinfleischextraktlösung, wobei die Culturen durch einen Apparat fortwährend geschüttelt wurden, so dass die Luft auf die nur 1 cm. hohe Flüssigkeitsschicht lebhaft einwirken konnte, zeigte sich absolut keine Verminderung der Gährthätigkeit, die Gläschen rochen ebenso stark als die nicht geschüttelten, und noch dazu früher, nach Butylalkohol. Ein weiterer Versuch wurde von Fitz in der Weise angeordnet, dass die Spaltpilze mehrmals in gährunfähigen Nährlösungen, die der Sauerstoffwirkung sehr ausgesetzt waren, umgezüchtet wurden; hernach hatten sie ihre Gährwirkung eingebüsst. Warum hat Fitz die Verminderung der Gährthätigkeit beim Umzüchten in gährunfähigen Lösungen untersucht? Es ist doch eine den Pilzforschern bekannte Thatsache, dass Pilze, die unter ungünstigen Verhältnissen sich vermehren, im Allgemeinen geschwächt werden. Gährungserreger verlieren dabei ihr Gährvermögen. Doch kann dies keineswegs als Sauerstoffeinwirkung gedeutet werden. Die Versuchsergebnisse von Fitz sind also keine Beweise.

Die Litteratur über den Einfluss des Sauerstoffs auf Gärungen enthält bisher nur hinsichtlich der Sprosshefe exakte Versuche, die wenigen Experimente mit Spaltpilzen sind vollständig unzureichend.

Eigene Versuche mit Spaltpilzgärungen.

Folgende Gesichtspunkte leiteten mich bei den Versuchen: 1) Es sollte nur eine möglichst bekannte, sehr gährtüchtige Pilzform zugegen sein, ich operirte also immer mit absoluten Reinculturen. 2) Die Einwirkung des Sauerstoffs sollte in der einen Cultur auf alle Weise befördert, in der anderen aber durch Zuleiten eines indifferenten Gases vollständig verhindert werden; auch erschien es wünschenswerth, einen dritten Parallelversuch ohne jede Gaszuleitung

auszuführen. 3. Die Gährthätigkeit sollte nicht nur im Allgemeinen, sondern die Thätigkeit des einzelnen Pilzindividuums festgestellt werden.

Bevor ich nun speciell auf die Versuche eintrete, sind noch einige allgemeine Bemerkungen vorzuschicken. Bezüglich der Wege zu Sterilisirung, Reincultur und Umzüchten, welche ich benützt habe, mag der Hinweis genügen, dass ich mich der besten, bisher bekannten, besonders auch der in neuester Zeit zu medicinisch-mycologischen Untersuchungen verwendeten Methoden bediente. Dagegen erscheint es unerlässlich, das benutzte Pilzmaterial eingehend zu besprechen.

Pilzmaterial.

Von den auf dem Heu vorkommenden Spaltpilzformen sind bisher drei isolirt und näher untersucht worden. 1. *Bacterium Fitz.*, Glycerinäthylbacterie. Dieselbe habe ich bei den eingehenden Versuchen über den Einfluss des Sauerstoffs auf Gährungen verwendet. 2. Der Glycerinbutylbacillus, das Buttersäureferment(?). Dieser Spaltpilz kam bei den Versuchen über die Eigenbewegung bei Gegenwart von Sauerstoff zur Verwendung. 3. *Bacillus subtilis*, die Heubacterie.

I. *Bacterium Fitz.*

Reincultivirung: Hierzu genügt es, wie mein Bruder (Hans Buchner) ausführlich nachgewiesen hat¹⁾, von der Decke, die sich auf ungekochtem Heuaufguss (bereitet durch 4stündiges Stehen bei 36° C. von Heu mit wenig Wasser) bei Zimmertemperatur nach einigen Tagen bildet, eine geringe Menge in sterilisirte Lösung von 2% Fleischextrakt und 5% Glycerin unter Zugabe der genügenden Quantität Calciumcarbonat zu übertragen²⁾. Bei 36° entsteht eine lebhafte

¹⁾ Untersuchungen über die niederen Pilze von C. von Nägeli. München 1881, S. 220. Der Name Glycerinäthylbacterie wird deshalb hier nicht beibehalten, weil es sich mittlerweile herausgestellt hat, dass auch andere Spaltpilze, Glycerin hauptsächlich unter Bildung von Aethylalkohol vergähren.

²⁾ *Bacterium Fitz.* dürfte wohl ebenso wie der Glycerinbutylbacillus ursprünglich aus dem Verdauungskanal der Wiederkäuer stammen.

Gährung; mehrfach fortgesetzte Uebertragung geringer Mengen in die gleiche sterilisirte Culturflüssigkeit führt durch Verdrängung aller übrigen concurrirenden Spaltpilzformen zur Reincultur.

Nährlösungen: Fleischextract als Zusatz zu den Gährflüssigkeiten liefert sehr gutes Nährmaterial. Bei meinen Culturen kam meistens eine Lösung von 2% Fleischextract und 5% Glycerin bei Zusatz von 5% Calciumcarbonat in Anwendung; auch in 0,5% Fleischextractlösung mit 5% Glycerin und 5% Calciumcarbonat entsteht sehr lebhafte Gährung. Dagegen bleiben Culturen in Lösungen von anorganischen Nährsalzen (Monokaliumphosphat, Magnesiumsulfat und Salniak) mit Glycerin und kohlensaurem Kalk immer spärlich, im Verhältniss zu jenen mit Fleischextract; auch die Zugabe von weinsaurem Ammoniak bringt keine wesentliche Besserung mit sich. In Nährgelatine mit Zucker, Fleischextract und Peptonzusatz wächst *Bacterium Fitz.* vorzüglich, schon bei Zimmertemperatur; die Gelatine wird nicht verflüssigt; häufig tritt Bildung von Gasblasen in Folge Gährwirkung ein.

Gährvermögen: Glycerin wird durch die Bacterie, wie wir seit den Versuchen von Fitz¹⁾ wissen, lebhaft vergohren; es entsteht Aethylalkohol, flüchtige und nichtflüchtige Säuren der Fettreihe, ausserdem Kohlendioxyd und Wasserstoff. (Fitz hat jedoch bei diesen Untersuchungen nicht mit Reinculturen gearbeitet, was den Werth der Resultate beeinträchtigt.) Ausserdem wird wahrscheinlich ein kleiner Theil des Glycerins zu Trimethylenglycol reducirt. Zucker wird ebenfalls sehr lebhaft vergohren; es entsteht viel Säure, wie aus der starken Kohlensäureentwicklung bei Zusatz von Calciumcarbonat zu entnehmen ist; der Geruch deutet auf die Bildung von Aethylalkohol. Stärke (Kartoffelstärke) wird durch *Bacterium Fitz.* ebenfalls vergohren, wenn auch nicht so lebhaft als Glycerin oder Zucker. Geruch nach Aethylalkohol.

1) Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. IX, u. ff.
Zeitschrift für physiologische Chemie IX.

In einer Lösung von milchsaurem Kalk mit Fleischextractzusatz vermehrt sich *Bacterium Fitz.* sehr rasch. Die Blasenbildung bleibt auch bei Zugabe von kohlen-saurem Kalk minimal, da die entstehenden Säuren durch den freiwerdenden Kalk gebunden werden. Auf Zusatz von Schwefelsäure entwickelt sich widerlicher Fettsäuregeruch.

Einwirkung von Jodtinktur: Das in normaler Glycerinnähr-lösung gezüchtete *Bacterium Fitz.* wird durch Jod nicht gebläut. Dessgleichen tritt auch bei längeren Stäbchen kein Zerfallen in kürzere Abschnitte ein, selten dass dieselben etwas torulos werden.

Verhalten gegen Gifte: Während *Bacterium Fitz.* in Lösungen von 5% Glycerin und 2% Fleischextract nebst Calciumcarbonat durch Zusatz von 2,5% Aethylalkohol nicht wesentlich geschädigt wird, ist es in einer sonst gleichen Lösung, aber mit nur 0,5% Fleischextract bereits sehr empfindlich dagegen; es vermehrt sich zwar noch, die Gährwirkung ist aber äusserst gering. In Lösungen von 20% Glycerin, 2% Fleischextract und Calciumcarbonat tritt keine Gährung ein.

Morphologie: Die Entwicklungszustände des *Bacterium Fitz.* wurden von Hans Buchner genau beschrieben¹⁾. In der normalen Glycerinfl-eischextractnähr-lösung erhält man kurze Stäbchen] von etwa 1 μ Breite und 1 $\frac{1}{2}$ —2facher Länge. In Culturen mit Kartoffelstärke oder mit milchsaurem Kalk sind die Stäbchen bei gleicher Breite meist wesentlich länger (bis 7 μ). Sporenbildung erhielt ich einmal in schwach-saurer Nährgelatine; die Stäbchen waren in der Mitte etwas angeschwollen und enthielten hier die stark lichtbrechende, grosse Spore. Dieselbe blieb bei dem gewöhnlichen Färbef-verfahren mit Anilinfarben ungefärbt, wie dies bei den Sporen der Spaltpilze als Regel bekannt ist.

Bewegungszustände: Bei Aussaat in die normale Glycerinnähr-lösung zeigen die Stäbchen, wenn der Höhegrad der Gährung erreicht ist (schon nach 12—24 Stunden, je nach Aussaat), nur geringe Eigenbewegung. Die meisten erscheinen ganz ruhig; viele sind in tanzender Bewegung, sie

¹⁾ L. cit., S. 221.

drehen sich um ihre Axen, ohne den Platz zu verlassen; sehr selten sind Stäbchen mit rascher Ortsbewegung. In älteren Culturen, die auch viele längere Stäbchen enthalten, ist im Allgemeinen die Eigenbewegung eine grössere.

II. Butylbacillus.

Dieser Spaltpilz, welcher bei Zugabe von Glycerin zu Heuwaschwasser die Bildung von normalem Butylalkohol veranlasst, ist noch lange nicht genügend untersucht. Selbst für die Reincultivirung lassen sich bis jetzt keine sicheren, unter allen Umständen zum Ziel führenden Methoden angeben. Ich erhielt eine Reincultur aus mit Glycerin versetztem, gährenden Heuwaschwasser mit Hülfe des Verdünnungsverfahrens. So ausgezeichnete Dienste diese Methode, welche Nägeli bereits seit dem Jahre 1871 anwendet¹⁾, sonst auch leistet, bleibt sie doch bei Reincultur des Butylbacillus häufig resultatlos. Dieser Spaltpilz stellt nämlich bei Aussaat zu geringer Mengen selbst in die besten Gährlösungen leicht die Gährthätigkeit, wie bereits früher erwähnt, vollständig ein, so dass derartige Culturen nicht zu ordentlicher Entwicklung gelangen. Hierdurch verliert auch die Methode ihre absolute Sicherheit, da das Ausbleiben von Vegetation in vielen der inficirten Kölbchen nicht ausschliesst, dass dennoch Pilze ausgesät wurden, es bleibt also fraglich, ob die benützte Verdünnung genügend war²⁾. Nach oftmaliger Umzüchtung (über 30 mal) in sterilisirte Glycerinfleischextractlösung (5% Glycerin, 2% Fleischextract, 5% Calciumcarbonat) machte sich die Gährung immer sehr rasch, schon 12 Stunden nach der Aussaat bemerkbar. Das Pilzmaterial konnte nun als vollkommen einheitlich betrachtet werden, da ausserdem auch die mikroskopische Untersuchung fremde Formen absolut nicht auffinden liess.

Glycerin wird von diesem Bacillus lebhaft vergohren, hauptsächlich unter Bildung von Butylalkohol; ich benutzte gewöhnlich eine 5 procentige Glycerinlösung. Eine Lösung

¹⁾ Untersuchungen über niedere Pilze, S. 12.

²⁾ A. Fitz empfiehlt dasselbe Verfahren zur Reincultur seines «Bacillus butylicus» bei Ausgang von Kuhexcrementen. Die beiden Spaltpilze dürften, wie später noch ausgeführt wird, identisch sein.

mit 20% Glycerin blieb trotz zweimaliger grosser Aussaat nach vier Wochen ohne Pilzentwicklung. Auch Rohrzucker wird unter Entwicklung eines starken Geruches nach Butylalkohol vergohren; ebenso Stärke (Kartoffelstärke); bei letzterer dauert jedoch der Beginn der Gärung bei gleicher Aussaat wesentlich länger, als bei Rohrzucker. Bringt man den Butylbacillus in eine Lösung von 5% Calciumlactat, 1% Fleischextract und 1% Kalk, so vermehrt sich derselbe sehr rasch; die mikroskopische Untersuchung zeigt die Stäbchen in lebhafter Bewegung. Nach einigen Tagen tritt deutlicher Geruch nach Butylalkohol auf. Wird die Gärung unterbrochen und Schwefelsäure hinzugesetzt, so stellt sich unverkennbar der Geruch nach Buttersäure ein. Dagegen ist das Aussehen einer Gärung von milchsaurem Kalk natürlich ein ganz anderes, als das einer Rohrzucker- oder Glyceringärung; es tritt selbstverständlich keine grössere Kohlensäureentwicklung ein.

Bei Behandlung des Butylbacillus mit Jodtinctur erhielt ich nie Blaufärbung; es wurde mit frischen und alten Culturen probirt, ja selbst mit Züchtungen in Kartoffelstärke-Fleischextractlösung. Die Stäbchen, auch lange Fäden, zeigten, nachdem sie durch Jod braun geworden waren, kein Zerfallen in kleinere Abschnitte.

In morphologischer Hinsicht erleidet der Butylbacillus je nach den Ernährungsbedingungen grosse Veränderungen. Besonders besitzt er eine grosse Menge von Involutionsformen. Bei Züchtung in der normalen Glycerin-Fleischextraktlösung erhielt ich Stäbchen von 0,6 μ Breite und 2,5—7 μ Länge; daneben kamen in derselben Cultur Fadenformen vor. Sehr häufig sind gekrümmte Stäbchen. Nachfolgend ist das mikroskopische Bild einer solchen Cultur bei 1000 maliger Vergrösserung zur Ansicht gebracht.



In jungen Züchtungen des Butylbacillus (in den ersten drei Tagen etwa) ist alles in Bewegung; in älteren erscheint

die Eigenbewegung wesentlich vermindert. Einmal sah ich sogar einen 100 μ langen Faden in fortschreitender Bewegung. Die meisten Stäbchen drehen sich deutlich um ihre Längsaxe und schiessen dabei lebhaft in der Lösung hin und her, gleichgültig, welches Ende gerade vorangeht. Die Eigenbewegung ist also meistens mit Ortsbewegung verbunden. In älteren Culturen kann man oft mehrfach gekrümmte Fäden beobachten, die das Aussehen von Zickzack- bis Wellenlinien besitzen, es fehlt ihnen nur die vollständige Regelmässigkeit der wirklichen Spirillen. Während sich die Fäden aber noch mit Anilinfarben leicht färbten, habe ich auch Involutionsformen getroffen, die den Farbstoff nur theilweise oder gar nicht aufnahmen; es waren dies sehr lange Fäden, die oft die abentheuerlichsten Knickungen und Biegungen zeigten.

Die Sporenbildung erfolgt nach Art von Stecknadelsporen; an dem einen Ende des Stäbchens zeigt sich ein längliches Köpfchen, das die stark lichtbrechende Spore enthält. In einigen Fällen hatten die Bacillen Keulenform angenommen, sie waren wohl in der Sporenbildung begriffen. Während nun in den ersteren Züchtungen nach der Reincultivirung in Glycerinfleischextractlösungen immer Stecknadelsporen zu finden waren, verschwanden dieselben nach oft wiederholter Umzüchtung in gleicher Nährlösung gänzlich.

Es erübrigt noch, das Verhältniss meines Butylbacillus zu Pasteur's *Vibrio butyrique*, zum *Clostridium butyricum* von Prazmowski und zum *Bacillus butylicus* von Fitz zu besprechen. Aller Wahrscheinlichkeit nach müssen dieselben als ein und der nämliche Organismus betrachtet werden. Die chemischen und die morphologischen Eigenschaften stimmen fast völlig überein; die wenigen Abweichungen lassen sich einerseits durch verschiedene Ernährungsmodificationen, andererseits dadurch erklären, dass nicht von allen Forschern immer völlig reines Pilzmaterial benützt wurde. Hierdurch liesse sich z. B. die Blaufärbung einiger weniger

Zellen, wie sie Prazmowski und Fitz bei Behandlung mit Jod manchmal erhalten haben, die ich aber nie beobachten konnte, verstehen (*Bacillus amylobacter*, van Tieghem!?).

III. *Bacillus subtilis*.

Dieser Spaltpilz, welcher sich wie die vorhergehenden auf dem Heu vorfindet, sei nur erwähnt, um die bis jetzt bekannten Unterscheidungsmerkmale, welche ihn von den erst beschriebenen trennen, aufzuführen.

Das Reinculturverfahren von Roberts und F. Cohn benützt die grosse Widerstandsfähigkeit der Sporen dieses *Bacillus* gegen die Siedehitze (eine Stunde einwirkend); die Sporen des *Bacterium Fitz.*, sowie die des *Butylbacillus* gehen beim Kochen früher zu Grunde. *Bacillus subtilis* lebt auf ruhenden Culturen ausschliesslich als Decke, wodurch sein grosses Sauerstoffbedürfniss dokumentirt wird; nur in sehr guten Nährlösungen erscheint die Flüssigkeit selbst getrübt. Durch Zusatz von Jodtinktur erfolgt keine Blaufärbung, dagegen zerfallen die meisten längeren Stäbchen in einzelne, getrennte Glieder. In einer Nährlösung von 5% Glycerin und 2% Fleischextract bei Zugabe von Calciumcarbonat bilden die Heubacillen lange Stäbchen, welche ganz wesentlich breiter als die des *Bacterium Fitz.* und die des *Butylbacillus* sind, so dass sie an ihrer plumpen Form von diesen unterschieden werden können. *Bacillus subtilis* besitzt in gewissen Stadien der Culturen eine grosse Beweglichkeit, welche an den *Butylbacillus* erinnert. Wie bekannt, ist die nahe Verwandtschaft des Heubacillus mit dem Milzbrandpilz durch Hans Buchner nachgewiesen worden. Als Gährungserreger wurde *Bacillus subtilis* noch nie angetroffen.

Im verflossenen Jahre hat G. Vandevelde Studien zur Chemie des *Bacillus subtilis* veröffentlicht¹⁾. Der Verfasser betrachtet diesen Spaltpilz als Gährungserreger. Die Versuche Prazmowski's²⁾ welcher

1) Diese Zeitschrift, Bd. VIII, S. 367.

2) Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte einiger Bacterienarten, 1880, S. 19.

zur gegentheiligen Annahme kam, werden als fehlerhaft angesehen. Vandevelde hat aber nur den einen Theil derselben, die Experimente in zugeschmolzenen Röhren, berücksichtigt; es scheint ihm entgangen zu sein, dass Prazmowski wörtlich weiterfährt: «Um jedoch vollständige Gewissheit zu erlangen, habe ich noch ein paar Versuche in grösserem Maasstabe ausgeführt.» Dazu wurden Glaskolben von 3 bis 4 Liter Capacität mit Dextrinlösung angewendet; im Allgemeinen verfuhr man nach den Methoden Pasteur's. Gährung trat nicht ein. Hans Buchner äussert sich in derselben Sache, wie folgt: «Nach vielen und vielseitigen Versuchen kann ich nunmehr bestätigen, dass *Bacterium subtile* in Lösungen, welche die verschiedensten Kohlehydrate enthalten, trotz reichlichster Vermehrung keine Spur von Gährung zu bewirken im Stande ist»¹⁾.

Wie steht es nun mit den Versuchen von Vandevelde. Seit Pasteur ist es Usus, durch niedere Pilze verursachte Zersetzungs Vorgänge dann als Gährungen zu bezeichnen, wenn deren Umfang ausser allem Verhältniss zum Körpergewicht der thätigen Hefe steht und also nicht gut durch den einfachen Stoffwechsel erklärt werden kann. Selbst angenommen, Vandevelde hätte mit Reinculturen des *Bacillus subtilis* gearbeitet, lassen sich aus den Versuchen doch kaum so grossartige Zersetzungs Vorgänge herausfinden. Bei der Einwirkung auf Fleischextract ist natürlich nicht daran zu denken; der Verbrauch an Kreatinin und Fleischmilchsäure zusammen ging nicht einmal über das Gewicht des unlöslichen Theiles der Bacillensubstanz hinaus und dieses war immer bei Weitem grösser als das Gewicht des entstandenen Ammoniaks plus den flüchtigen Fettsäuren, selbst bei Versuchsdauer von vielen Wochen. Bei meinen unten zu beschreibenden Versuchen mit *Bacterium Fitz.* wurde von den Spaltpilzen innerhalb 29 Stunden an Glycerin das 125fache (Versuch A), das 600fache (B), das 250fache (C) des Trockengewichtes der mittleren Pilmenge (Pilmenge am Anfang und Ende dividirt durch zwei) vergohren. Aus Glycerin erhielt Vandevelde folgende «Gährungsprodukte»: Keine Alkohole, etwa 0,5 bis 1,9 gr. flüchtige Fettsäure; 1,27 bis 3 gr. Glycerin wurden zerlegt. Zeitdauer 3½ bis 9 Wochen. Da die Flüssigkeit nur 0,7% Glycerin enthielt und in 0,36% Fleischextract eine gute und genügende Nahrung geboten war, so hätte in der langen Versuchsdauer jedenfalls alles Glycerin angegriffen werden müssen, wenn es sich um Gährungsvorgänge gehandelt hätte; dagegen blieben 4,85 bis 2,41 gr. unzersetzt. Noch deutlicher sprechen die Resultate bei der ersten «Traubenzuckergährung» Vandevelde's. Zeitdauer 7 Wochen, 7,2 gr. Traubenzucker zerlegt, ca. 0,35 gr. flüchtige Fettsäure und 0,7 gr. Milchsäure gebildet. Was ist aus dem übrigen, verschwundenen Traubenzucker geworden? Vandevelde hilft

1) Untersuchungen über niedere Pilze, S. 188.

sich durch die Annahme, derselbe sei, wie im zweiten Versuch, in Mannit übergeführt worden; damit stimmt aber die auffallend kleine Menge gebildeter Milchsäure nicht überein. Zum Vergleiche stelle ich eine Rohrzuckergärung durch *Bacillus butylicus*, wie sie Fitz beschreibt¹⁾, daneben: Zeitdauer 25 Tage; Zucker zerlegt 77,9 gr.; Buttersäure 80,4 gr., Rohalkohol 0,92 gr. entstanden. Dabei waren noch ungünstige Ernährungsbedingungen (lediglich anorganische Salze) und eine verhältnissmässig hohe Concentration der Zuckerlösung (30%) vorhanden, während Vandavelde mit 0,36 procentiger Fleischextractlösung und nur 0,7 procentiger Traubenzuckerlösung operirte, ferner bei doppelt so grosser Versuchsdauer. Der zweite Versuch von Vandavelde mit Traubenzuckerlösung bringt ein sehr interessantes Resultat. Versuchsdauer 6 Wochen, Traubenzucker verschwunden 10 gr. (alles), gebildet Alkohol 0,8 gr. (ungetrocknet), flüchtige Fettsäuren ca. 0,5 gr., Milchsäure 4,08 gr., Mannit 5,1 gr. Wodurch lässt sich der grosse Unterschied zwischen diesen Ergebnissen und denen des ersten Versuches erklären? Es ist sehr naheliegend, anzunehmen, dass sich bei Versuch 2 eine grössere Anzahl fremder Pilze, namentlich Gärungserreger, eingeschmuggelt hatten. Der gesammte Traubenzucker ist schon nach 6 Wochen zerlegt; Gärungserreger sind durch Abschluss der Luft, wie er bei diesem Versuche stattfand, nicht gärfähigen Formen, besonders auch dem *Bacillus subtilis* gegenüber im Vorthail, da sie des freien Sauerstoffs leichter entbehren können. Der mikroskopische Befund bei Unterbrechung des Versuches kann allein nicht als Zeugnis für die Reinheit der Cultur angesehen werden, derselbe besagt nur, dass sich keine, sehr auffallend geformten fremden Pilze eingefunden hatten. Allerwenigstens sind also weitere Bestätigungen abzuwarten, bevor die Resultate dieses zweiten Versuches als feststehend erachtet werden können.

Bezüglich der Reinheit der Culturen Vandavelde's im Allgemeinen möchte ich noch Folgendes bemerken: Angenommen, das Ausgangsmaterial sei ein reines, einheitliches gewesen, was aus der Beschreibung des Verfahrens zur Reinzüchtung nicht sicher hervorgeht («Die Flüssigkeit wurde eine Stunde lang erhitzt», die Vorschrift verlangt einstündiges Kochen, wobei selbstverständlich die Zeit des Anwärmens nicht inbegriffen ist²⁾), selbst angenommen, das Ausgangsmaterial sei rein gewesen, so kann es sich bei den Versuchsculturen ganz anders verhalten haben. Die Nährlösungen wurden nicht sterilisirt; das Auskochen (in welcher Weise dasselbe geschah, ist nicht angegeben), ist durchaus kein sicheres Verfahren, um die Sporen im Fleischextract, an den Glaswänden oder an den Wappfropfen zu tödten. Nun mag zwar die Gefahr

¹⁾ Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. XV, S. 874.

²⁾ Untersuchungen über niedere Pilze etc. S. 187. Vergl. auch Fitz: Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. XVII, S. 1195.

des Aufkommens fremder Pilzformen, besonders von Gährungserregern, bei den Versuchen über die Zersetzung des Fleischextracts selbst bei wochenlanger Versuchsdauer nicht sehr gross sein, ganz anders verhält es sich aber bei den Culturen mit gähurfähigen Körpern, mit Glycerin, mit Traubenzucker. Die Ausübung der Gährthätigkeit unterstützt die Gährungserreger im Concurrrenzkampf, wie bekannt, ausserordentlich, so dass auch bei ursprünglich minimaler Anwesenheit von solchen nach $3\frac{1}{2}$ bis 9 Wochen, bei Unterbrechung der Versuche, von einer Reincultur des *Bacillus subtilis* nicht die Rede sein darf. Die Resultate der mikroskopischen Untersuchung beweisen, wie schon erwähnt, nur, dass keine auffällig verschiedenen fremden Pilzformen sich eingefunden hatten. «Die Sporen waren kleiner, die Stäbchen schlanker», das ist kein Zeugniß gegen Reinheit der Culturen; ebensowenig kann es aber auch als Beweis für die Reinheit erachtet werden, dass der veränderte *Bacillus* durch Züchtung bei Gegenwart von Luft in Fleischextractlösung seine frühere Gestalt wieder annahm. Diese Beobachtung macht es nur wahrscheinlich, dass die Mehrzahl der vorhandenen Pilze dem *Bacillus subtilis* angehörten, woran aber von vorneherein Niemand zweifeln wird.

Darauf, dass die Culturflüssigkeit nicht stark sauer reagirend werde, nimmt Vandevelde trotz der Wichtigkeit dieser Bedingung für das Befinden der Heupilze nur bei den Versuchen mit Glycerin und jenen mit Traubenzucker Rücksicht; wenigstens ist bei den Fleischextractlösungen nichts davon erwähnt. Die Resultate scheinen auch auf diesen Fehler hinzuweisen. Die Mengen entstandener flüchtiger Fettsäuren sind nur bei zwei Versuchen, C und E, bestimmt worden; die Procentzahlen der Bariumsalze derselben, bezogen auf den zugesetzten Fleischextract liegen weit auseinander; berechnet man aber den wirklichen Gehalt an flüchtigen Fettsäuren, bezw. deren Bariumsalze und bringt noch die im Fleischextract hinzugefügte Menge in Abzug, so erhalten wir beinahe dieselben Zahlen, 0,252 gr. für C und 0,222 gr. für E. Dabei war C nur $3\frac{1}{2}$ Wochen, E 7 Wochen in Gang, C enthielt 20% Fleischextract, E 10%. Wie kommt nun dieser ähnliche Säuregehalt zu Stande? Ganz einfach; dieser Säuregehalt ist bei Nährlösungen von 500 cc. Volum (in C und E) annähernd die Grenze, über welche hinaus *Bacillus subtilis* seine Funktionen nicht mehr auszuüben, also auch keine Säure zu bilden vermag. Der Unterschied in der Lage dieser Grenze bei C und E erklärt sich dadurch, dass alle Bacterien bei sehr guter Nahrung (C) andere ungünstige Bedingungen leichter zu ertragen vermögen.

Auch auf das Eintreten von Involutionerscheinungen in alten Culturen hat Vandevelde keine Rücksicht genommen. Der Inhalt der Pilzzellen tritt zum Theil wieder aus den Zellen aus und vertheilt sich in der Flüssigkeit, besonders wenn bei lang dauernden Versuchen ungünstige Lebensbedingungen für die Pilze (stark saure Reaction) herrschen.

Trotz Allem müssen die mühevollen Untersuchungen Vandevelde's als sehr verdienstlich betrachtet werden, zumal sie namentlich in chemischer Hinsicht mit grosser Genauigkeit ausgeführt wurden.

Versuchsordnung.

Es waren eine ganze Reihe von Versuchen (10 Doppelversuche) nothwendig, um die Methodik soweit auszubilden, dass sie sämtlichen Anforderungen entsprach. Ich unterlasse es jedoch, auf dieselben einzugehen, da keiner davon als in allen Theilen gelungen bezeichnet werden kann. Die nachfolgenden Angaben beziehen sich daher nur auf den letzten, in jeder Hinsicht entsprechenden Versuch.

Ein Kolben von 500 cc. Inhalt wurde durch einen Wattepfropfen verschlossen, in den zwei rechtwinkelig gebogene Röhren sorgfältig eingewickelt waren. Das erste Glasrohr, a, reichte bis auf den Boden des Kolbens hinab und war an seinem anderen Ende mit einer Wattkappe zugebunden; das zweite Glasrohr, b, endigte kurz unterhalb des Wattepfropfens und enthielt in seinem oberen Theil eine combinirte Watt- und Schlackenwollschicht (auf beiden Seiten durch eine Verjüngung der Röhre festgehalten). Solcher Kolben stellte ich zwei fertig und befreite beide durch Erhitzen im Trockenkasten, eine Stunde lang auf 160°, von den an der Innenwandung oder im Pfropfen befindlichen Pilzkeimen. Nach dem Erkalten wurden die Kolben durch vorher präparirte, tadellose Korkstopfen, die je zwei Durchbohrungen hatten und in der Mitte durchschnitten waren, verschlossen; dieselben liessen sich ohne Herausnahme der Wattepfropfen noch der Röhren einfügen (die Wattepfropfen wurden hierbei etwas nach abwärts gedrückt). Schliesslich wurden die Korke mit einer Schicht von Siegellack und Wachs überzogen, um sie luftdicht zu machen.

Gleichzeitig wurden drei dickwandige, cylindrische Flaschen mit je 200 cc. Gährflüssigkeit zu 5% Glycerin, 0,5% Fleischextract nebst 2 gr. Calciumcarbonat beschickt und im Dampfstopf sterilisirt. ($\frac{5}{4}$ Stunden Anwärmen, 1 Stunde bei 115°.)

Jede der Flaschen war mit einem Wattepfropfen verschlossen, durch den eine gut eingefügte, rechtwinkelig gebogene Glasröhre bis auf den Boden des Gefäßes hinabführte. Der obere Theil der Glasröhre lief in eine feine Spitze aus, über die ein Stück grauen Kautschukschlauches geschoben war; darüber war wieder eine Wattkappe gebunden. Ferner wurden zwei ganz ähnlich beschaffene Flaschen mit je 400 cc. destillirten Wassers ebenfalls im Dampftopf sterilisirt.

Nachdem Alles erkaltet war, ging es an die Füllung der Kolben.

Die Röhren a wurden mit je einem der Gefäße mit sterilisirtem Wasser (durch die schon in diesen befindlichen Glasröhren mit Kautschukschläuchen) verbunden und die Kolben durch Saugen an den Röhren b mittels eines Aspirators bis an die Wattepfropfen mit Wasser gefüllt (die Röhren b schneiden nach Einsetzen der Korke mit den Wattepfropfen ab). Nun wird durch b unter Druck reiner Sauerstoff in den einen Kolben, reiner Wasserstoff in den andern eingeleitet und damit das sterilisirte Wasser (durch die Röhren a) wieder gänzlich hinausgedrängt. Die lange Watt- und Schlackenwollschicht in b befreit hierbei die Gase von allen Pilzkeimen. Jetzt werden die Röhren a mit je einer der Flaschen, in denen sich die sterilisirte Nährlösung befindet, verbunden; man schiebt die verjüngte Spitze der Glasröhren in diesen Flaschen direkt in die Röhren a hinein und stülpt das (schon vor dem Sterilisiren) umgekrempte Ende des Kautschukschlauches darüber (über a); hierdurch ist die Verbindung luftdicht und ohne Gefahr der Verunreinigung durch fremde Pilze hergestellt. Durch Saugen bei b wird nun die Gährflüssigkeit in die Kolben hereingezogen und hierbei durch Schütteln der Flaschen mit den Gährflüssigkeiten Sorge getragen, dass auch der am Boden sitzende Kalk möglichst vollständig herübergesaugt werde. Sodann fügt man an die Röhren a (mit Hülfe der bereits daran befindlichen Gummischläuche) zwei sterilisirte Glasröhrchen mit langen Watt- und Schlackenwollschichten an, die dazu bestimmt sind, die einzuleitenden Gase, von allen Pilzen zu befreien.

In den Kolben A und B befand sich nun die Gährflüssigkeit als 3,5 cm. hohe Schicht und darüber eine Sauerstoff-, bzw. eine Wasserstoffatmosphäre; beide kamen in den Brütkasten von 37° C. Temperatur und zugleich in den Schüttelapparat zu stehen, welcher die Flüssigkeit alle 10 Sekunden in lebhaftes Schwanken versetzte; weiter wurde durch die Röhren a Sauerstoff bei A, Wasserstoff bei B in kräftigem Strome eingeleitet (während die Röhren b durch einen kurzen Schlauch mit je einem Glasröhrchen mit feiner Oeffnung verbunden wurden, um hier einen beständigen Gasstrom nach

aussen zu erhalten, als Schutz gegen Diffusion). In beiden Kolben lagert sich nach einiger Zeit eine dichte, etwa 0,5 cm. dicke Schicht von Gasbläschen auf die Flüssigkeit, doch wird sie ab und zu durch das Schütteln zerrissen.

Der Sauerstoff war im Gasometer über Wasser aufgefangen worden und strich vor der Einleitung über Natronkalk und Chlorcalcium; der Wasserstoff, aus reinem Zinn und reiner Salzsäure bereitet, wurde durch Wasser und ferner durch eine Lösung von schwefelsaurem Silber gewaschen und schliesslich auch durch ein U-Rohr mit Chlorcalcium geleitet. Die zur Wasserstoffleitung benutzten Schläuche bestanden aus schwarzem Gummi und hatten 3 mm. Wandstärke; an den Verbindungsstellen waren sie mehrmals festgebunden. Bei einem Drucke von 50 cm. Wasser schlossen die beiden Versuchskolben inclusive der Leitungen vollkommen.

Gleichzeitig mit dem Kolben A und B stellte ich auch die dritte der sterilisirten Flaschen mit Gährflüssigkeit in den Brütkasten, aber nicht in den Schüttelapparat.

Dieselbe hatte 500 cc. Inhalt und cylindrische Form, so dass die 200 cc. Gährflüssigkeit darin eine 5 cm. hohe Schicht einnahmen, demnach betrug die Oberfläche der Flüssigkeit 40 qcm. Ueber die Flasche war eine Wattkappe gebunden.

Nachdem innerhalb drei Stunden ungefähr 3 Liter von jedem Gase in die Kolben A und B eingeleitet waren, konnte man die Gährflüssigkeiten als mit den betreffenden Gasen so ziemlich gesättigt betrachten; die Einleitung wurde unterbrochen und die Gährlösungen in A und B, sowie in C inficirt.

Hierzu waren bereits 24 Stunden früher 6 cbcm. einer Reincultur des Bacterium Fitz. in eine sterilisirte Nährlösung von 60 cbmm. mit 5% Glycerin, 0,5% Fleischextrakt bei Zugabe von 1,5 gr. Calciumcarbonat übertragen worden; diese Nährlösung befand sich in einem sog. Saftgläschen, welches durch einen Wappropfen mit zwei eingewickelten Röhren verschlossen war. Die Einrichtung der Röhren, genau gleich derjenigen, welche bei den Flaschen mit Nährlösung oben beschrieben wurde, ermöglichte es, nach der Reihe je eine derselben mit der Röhre a des Kolbens A, dann mit a des Kolbens B luft- und pilzdicht zu verbinden und durch Saugen an den Röhren b einen Theil der Gährflüssigkeit, nachdem dieselbe kräftig umgeschüttelt war, aus dem Saftgläschen in die Kolben hineinzuziehen. Der Rest der Inficirflüssigkeit, etwa ein Drittel derselben, wurde in die Flasche C als Aussaat direkt eingegossen.

Dann kamen sämtliche drei Versuchsculturen wieder in den Brütkasten und wurde bei A und B die Gaseinleitung aufgenommen (nachdem die Röhren a wieder mit den Glas-

röhrchen mit Wattschicht verbunden waren). An die Röhren b der Kolben A und B fügte man ferner die Absorptionsapparate an, um das entstandene Kohlendioxyd aufzufangen.

Diese Absorptionsapparate bestanden je aus einem Bimssteinthurm mit Schwefelsäure, aus einem Chlorcalciumrohr (diese vier Apparate wurden erst mit CO₂-freiem Sauerstoff, bezw. Wasserstoff gefüllt), aus einem Liebig'schen Kugelapparat mit Kalilauge, aus einem Aetzkalirohr (die letzteren vier Apparate sind abgewogen) und endlich aus einem kleinen Aetzkalirohrchen zum Schutze gegen von hinten eindringende Feuchtigkeit. Die Absorptionsapparate schliessen unter sich vollkommen und sind durch gute Gummischläuche von 3 mm. Wandstärke mit den beiden Kolben verbunden.

Die in C gebildete Kohlensäure wird nicht bestimmt. Es schien mir der Kautschukverbindungen halber wenig räthlich, den Schüttelapparat während der ganzen Versuchsdauer (29 Stunden) beständig in Gang zu lassen; er wurde daher nur 5 mal für je 15 Minuten in Thätigkeit gesetzt und zwar öfter gegen das Ende des Versuches hinaus; gleichzeitig ward auch immer noch die Gaseinleitung verstärkt. Sonst gestaltete sich die Gasdurchleitung ziemlich regelmässig; sie schwankte zwischen 170 und 380 cbcm. in der Stunde; im Ganzen wurden während des Versuches 8200 cbcm. Sauerstoff und 6200 cbcm. Wasserstoff eingeleitet. Das am Ende der Absorptionsapparate von A entweichende Gas, in einem Probirrohrchen über Wasser aufgefangen, entzündet einen glimmenden Spahn sofort, während das durch B streichende, in gleicher Weise aufgesammelt, ohne Knall verbrennt. Ebenso wird das Schliessen der Versuchskolben durch Abquetschen der Gasleitungsschläuche hinter denselben mehrmals geprüft; nachdem der Druck ausgeglichen ist, treten keine Blasen in die Kolben. Dagegen ist am Ende des Versuches, wo gerade diese Untersuchung wiederholt wird, für A eine so rasche Absorption des Sauerstoffs durch die Gährlösung zu constatiren, dass der Zutritt von Blasen langsam fort dauert.

Ergebnisse bei Unterbrechung der Versuche.

29 Stunden nach Inficirung wurden die Versuche A, B und C aus dem Brütkasten genommen. Die Gährflüssigkeit

im Kölbchen A, wo der Sauerstoff eingewirkt hatte, war sehr trüb, auf der Oberfläche zeigten sich einige grosse Gasblasen, die bald platzten (von der Sauerstoffeinleitung herrührend); die Flüssigkeit in B (Wasserstoffeinleitung) war merklich weniger trüb, als jene in A. Die Gährlösung in Glas C zeigte sich ähnlich trüb, wie die in B; auf der Oberfläche lagerte aber eine dicke, weisse Schuamschicht, aus ganz kleinen Blasen bestehend, welche nicht zerfloss. Alle drei Flüssigkeiten reagierten beinahe neutral, die in C erwies sich etwas mehr säuerlich als die anderen. Der Geruch war bei allen drei Versuchen derselbe, wie ich ihn stets bei Glycerin-gährungen durch das Bacterium Fitz. beobachtet habe. Die microscopische Untersuchung der drei Gährflüssigkeiten ergab, soweit danach ein Urtheil gestattet werden kann, überall Reinculturen; es wurden von allen dreien mit Gentiana violet gefärbte Präparate hergestellt und in Canadabalsam aufbewahrt. Die absolute Reinheit der Culturen wurde auf anderem Wege bewiesen, worüber weiter unten berichtet wird.

Folgende drei Fragen sollten nun durch die genaue Untersuchung beantwortet werden:

1. Wie viel Glycerin wurde in jedem Falle vergohren:
2. Wie viel Spaltpilze waren dabei vorhanden.
3. Wie viel Kohlensäure wurde gebildet.

Die letzte Frage stellte ich mir hauptsächlich, um auch eine allenfallsige Veränderung des Gährvorgangs in chemischer Hinsicht wahrnehmen zu können.

Glycerinbestimmung.

Von allen bisher bekannten Glycerinbestimmungsmethoden liefert nur die von Clausnitzer brauchbare Resultate¹⁾. Wie bekannt, verdampft man nach derselben die Glycerinlösung mit einem Ueberschuss von Aetzkalk und bei Zusatz von Marmor auf dem Wasserbade zur Trockne; der Aetzkalk hindert die Verdampfung von Glycerin beinahe vollständig. Der trockene Rückstand oder ein Theil desselben wird dann in einem Extractionsapparat mehrere Stunden lang

¹⁾ Fresenius's Zeitschrift, Bd. XX, S. 58.

durch heissen, wässerigen Alkohol ausgezogen; die Lösung versetzt man mit $\frac{5}{3}$ ihres Volums Aether, filtrirt dann und vertreibt im Filtrat vorsichtig den Aether und einen Theil des Alkohols; wird diese letzte Operation auf dem Wasserbade in einem schief liegenden Kölbchen vorgenommen, so treten keine Verluste ein. Dann bringt man das Kölbchen aufrechtstehend und mit Filtrirpapierkappe bedeckt in einen Trockenkasten von 100—110° und lässt ihn darin so lange, bis innerhalb zwei Stunden nur mehr eine minimale, constante Gewichtsabnahme erfolgt. Das zurückbleibende Rohglycerin ist wasserfrei, enthält aber noch Aschenbestandtheile und Extractivstoffe. Die ersteren können durch Verdampfen des Glycerins und Glühen des Rückstandes nachträglich bestimmt werden.

Hatte nun Clausnitzer bei Glycerinbestimmungen im Bier annähernd richtige Resultate erhalten, so konnte ich um so eher hoffen, die Methode bei meinen Gährflüssigkeiten verwenden zu können, als hier der Procentsatz an Glycerin ein viel höherer ist, besonders aber gegenüber dem Gehalt der Lösungen an sogenannten Extractivstoffen eine ganz andere Rolle spielt. Mit Rücksicht darauf konnte der Marmorzusatz beim Eindicken von vornherein unterbleiben. Zunächst wurden einige Controlbestimmungen ausgeführt. Der Wassergehalt des zu verwendenden Glycerins durch Trocknen desselben bei 100—110° in der beschriebenen Weise mehrmals ermittelt, stimmte mit dem aus dem specif. Gewicht sich ergebenden völlig überein. Nun wurde eine Lösung bereitet mit 5% Glycerin und 0,5% Fleischextract und mit kohlen-saurem Kalk geschüttelt; dann kam eine bestimmte Menge der klaren Flüssigkeit zur Untersuchung. Bezüglich der Methode erwies es sich in der Folge auch erlaubt, bei Glycerinbestimmung in diesen Lösungen das Eindicken und Extrahiren ganz zu unterlassen und den Alkohol und Aether gleich direkt zu der zu untersuchenden Flüssigkeit zuzufügen; im Weiteren blieb ich den Clausnitzer'schen Vorschriften getreu. Versuch II und III in der kleinen Tabelle I sind ohne Eindicken und Extrahiren ausgeführt.

Glycerinprobebestimmungen (Tabelle I).

Nr.	Zugesetztes Glycerin (a).	Gefundenes Rohglycerin (x).	Aschengehalt		Differenz (x-y)-a
	gr.	gr.	in gr. (y)	%	gr.
I.	0,2071	0,218	0,0062	2,85	0,0047
II.	0,2280	0,233	0,0030	1,30	0,0020
III.	0,2280	0,243	0,0029	1,24	0,0031

Die 4. Spalte zeigt die wesentliche Steigerung des Aschengehaltes des Rohglycerins durch das Eindicken mit Aetzkalk. Die letzte Spalte enthält die Menge der gelösten Fleischextractbestandtheile und zeigt zugleich die Grösse der Bestimmungsfehler. Die Methoden erwiesen sich sonach als brauchbar.

Bei Unterbrechung der Versuche A, B und C wurden nun je 5 ccm. der Gährflüssigkeit entnommen und der Glyceringehalt ermittelt. Bei A und B wurden zwei solcher Bestimmungen ([1] und [2]) ausgeführt. 36 Stunden später, während deren die Gährflüssigkeiten in Schnee gestanden hatten (Temperaturmaximum + 0,6° C.), wurden abermals von A, B und C je 5 ccm. auf den Glyceringehalt untersucht (3). Von sechs dieser Analysen wurden Aschenbestimmungen im Rohglycerin gemacht; die Resultate schwankten zwischen 2,67 und 3,39% des Rohglycerins, so dass als Durchschnittsaschengehalt 2,95 % in Berechnung gezogen werden konnte. Unter Berücksichtigung des Volumens der Gährflüssigkeiten ergab sich deren Gesamtgehalt an Glycerin (dabei wurde das arithmetische Mittel zwischen den Bestimmungen [1] und [2] in Anrechnung gebracht). Um die Menge des vergohrenen Glycerins zu erhalten, schien es von vorneherein unerlässlich, den Glyceringehalt der Culturflüssigkeiten nach dem Sterilisiren im Dampftopf zu bestimmen. Es wurden von jeder Culturflüssigkeit 5 ccm. in Untersuchung gezogen. Die Resultate stimmten bis auf 1 mgr., Glycerin war etwas über 9 % verdampft. Weiters musste auch die bei der Inficirung der Gährlösungen hinzu-

gekommene Glycerinmenge berücksichtigt werden¹⁾. Auf diese Weise liess sich die Gesamtglycerinmenge vor der Gährung ermitteln. Daraus ergibt sich dann im Zusammenhalt mit der Glycerinmenge bei Unterbrechung der Gährung das Gewicht des vergohrenen Glycerins. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle II zusammengestellt.

Resultate der Glycerinbestimmungen (Tabelle II).

	Vor der Gährung.		Nach der Gährung.		Vergohrenes Glycerin.	
	Roh-glycerin in 5 ccm.	Gesamt-glycerin aschefrei.	Roh-glycerin in 5 ccm.	Gesamt-glycerin aschefrei.		
	gr.	gr.	gr.	gr.	gr.	%
A (Sauerstoff.)	0,221	8,424	0,174 (1) 0,177 (2) 0,159 (3)	6,522	1,902	22,6
B (Wasserstoff.)	0,220	8,549	0,182 (1) 0,183 (2) 0,168 (3)	7,317	1,232	14,4
C (Controlversuch)	0,220	8,601	0,186 (1) — (2) 0,172 (3)	7,220	1,381	16,1

Da es mir bei frühern Versuchen mit Glyceringahrungen durch *Bacterium Fitz.* sehr wahrscheinlich geworden war, dass auch bei diesen ein kleiner Theil des Glycerins in Trimethylenglycol umgewandelt wird, wie es Freund²⁾ und später auch Fitz für Glycerinbutylgahrungen festgestellt haben, so hielt ich es für geboten, darauf hin zu untersuchen. 35 gr. Rohglycerinruckstande, welche ich bei sechs Gährungen durch *Bacterium Fitz.* mit lebhafter Sauerstoffeinleitung erhalten hatte, und 32 gr. Rohglycerin, welche bei Gährungen durch denselben Spaltpilz mit Wasserstoffzufuhr

¹⁾ Hierbei war es jedoch unmöglich, das in der Infecirflussigkeit bereits wieder vergohrene Glycerin in Abzug zu bringen. Die Menge desselben ist nicht bekannt; jedenfalls ist sie aber sehr gering (etwa 1%) und kann der dadurch entstehende Fehler nur eine ganz kleine, ausgleichende Aenderung der Verhältnisse zwischen den vergohrenen Glycerinmengen zur Folge haben.

²⁾ Monatshefte für Chemie, II, 1881, S. 636.

zurückgeblieben waren, wurden 2 mal mit je 30 ccm. Aether, dann 2 mal mit 30 ccm. Aether- und Alkoholgemisch ($\frac{2}{3}$ Aether, $\frac{1}{3}$ Alkohol) andauernd geschüttelt, die Lösungen von Aether und Alkohol befreit und die Rückstände der Fractionirung unterworfen. Von 200—250° gingen 2 gr. der Rückstände von Sauerstoffgährungen, 1,5 gr. der Rückstände von Wasserstoffgährungen über. Beide Fraktionen wurden nochmals destillirt; zwischen 205 und 220° erhielt ich von beiden nur einige wenige, stark gelb gefärbte Tropfen. Um noch einmal fractioniren zu können, wurden die beiden Portionen vereint. Von 206—208° (uncorrigirt) destillirten ein paar Tropfen, die noch gelb gefärbt waren und gerade zu einer Analyse ausreichten.

	Berechnet für:			Gefunden:
	C ₃ H ₈ O ₃	C ₃ H ₈ O ₂		
Kohlenstoff	52,17%	47,37%	Kohlenstoff	47,95%
Wasserstoff	8,70 «	10,53 «	Wasserstoff	10,17 «

Die minimale Bildung von Trimethylenglycol bei der Glyceringährung durch Bacterium Fitz ist also annähernd gleich gross, wird Sauerstoff oder Wasserstoff zugeleitet. Die Bestimmung des vergohrenen Glycerins kann durch diese verschwindenden Unterschiede nicht beeinträchtigt werden.

Stellen wir nun die Menge des vergohrenen Glycerins nebeneinander und setzen wir die bei A (Sauerstoff) gefundene = 100, so ist sie bei B (Wasserstoff) = 64,8, beim Controlversuch C = 72,6.

Bestimmung der Pilzzahlen.

Bringt man eine geringe bekannte Menge (3 cbmm.) der (vorher tüchtig geschüttelten) Gährflüssigkeit, von welcher der Pilzgehalt bestimmt werden soll, in ein bestimmtes Quantum sterilisirten Wassers (9 ccm.), schüttelt kräftig und überträgt hiervon nochmals eine geringe, bestimmte Menge (3 cbmm.) in flüssig gemachte Nährgelatine, so ist der Pilzgehalt der letzteren ein bestimmter Theil der aus der Gährflüssigkeit ursprünglich entnommenen Pilzzahl $\left(\frac{1}{3000}\right)$. Der Pilzgehalt der Nährgelatine ist nun leicht festzustellen. Man erzielt durch ge-

nügendes Hin- und Herbewegen der noch flüssigen Masse eine völlige Vertheilung der Pilze in derselben und giesst dann die Gelatine in ein sterilisirtes Gefäss mit flachem Boden aus (sehr geeignet sind hierzu sog. Erlenmeyer'sche Kölbchen, welche durch Wattpfropfen verschlossen werden); die Gelatine erstarrt und jeder Pilz bleibt inmitten derselben da festgehalten, wo er sich im Moment des Erstarrens gerade befand. Bei Zimmertemperatur entwickelt sich nun allmählich von jedem einzelnen Keime aus eine Colonie, welche schliesslich in Form eines weissen Pünktchens mit freiem Auge sichtbar wird. (Bei Bacterium Fitz. in Nährgelatine mit Zucker, Fleischextract und Peptonzusatz schon nach 5 bis 8 Tagen.) Die Zahl dieser Colonien, deren jede bei richtiger Verdünnung von den übrigen isolirt bleibt, gibt dann im Zusammenhalt mit der Grösse der angewendeten Verdünnung und dem Volumen der ursprünglichen Gährflüssigkeit deren Gesamtpilzgehalt.

In dieser Weise wurde nun die Inficirflüssigkeit sowohl, als die Culturen A, B und C bei Beendigung der Versuche untersucht und zwar jede derselben 3mal. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle III enthalten.

Pilzzahlen (Tabelle III).

	Pilze in der Gelatine- cultur.	Ver- dünnungs- zahl.	Pilze in 1 cbmm.	Pilzmenge am Anfang (Aussaat).	Pilzmenge am Schlusse.
Inficirflüssig- keit.	48	2766 (1)	43 000	—	—
	43	2833 (2)			
	49	2700 (3)			
A (Sauerstoff.)	408	2666 (1)	755 000	727 Millionen	145 000 Mill.
	91	2833 (2)			
	334	2833 (3)			
B (Wasserstoff.)	29	2833 (1)	91 000	877 Millionen	19 000 Mill.
	35	2766 (2)			
	34	2733 (3)			
C (Controlversuch)	48	2800 (1)	223 000	903 Millionen	45 000 Mill.
	110	2800 (2)			
	83	2733 (3)			

Die Verwendbarkeit der beschriebenen Methode für Bestimmung der Pilzzahl in Culturflüssigkeiten hängt, abgesehen davon, dass nicht alle Spaltpilzarten in Nährgelatine gedeihen, von mehreren Umständen ab. Zunächst müssen die Bacterien annähernd gleichmässig in der Flüssigkeit vertheilt sein. Dann ist es selbstverständlich, dass mit dieser Methode nur die Zahl der Pilzstäbchen oder Pilzfäden bestimmt werden kann. dagegen nicht die Zahl der einzelnen Pilzzellen, für den Fall nämlich, dass ein Stäbchen oder ein Faden aus mehreren Zellen zusammengesetzt sein sollte, was bei vielen Spaltpilzarten Regel ist. So wäre die Methode z. B. bei Glycerinbutylgährungen nicht so geeignet, da bei dem Butylbacillus ganz lange Fadenformen neben kurzen Stäbchen in grosser Anzahl zu finden sind. Ferner ist es wesentliche Voraussetzung, dass die Cultur noch jugendlich und kräftig sei, damit sich auch aus jeder Bacterie eine Colonie entwickeln könne. Obgleich alle diese Bedingungen für Bacterium Fitz. und die hier untersuchten Gährlösungen erfüllt waren, zeigte es sich doch unbedingt nöthig, einige von einander völlig unabhängige Bestimmungen auszuführen, wie es Spalte 1 obiger Tabelle ausweist.

Diese Zählmethode gibt zugleich die sichersten Anhaltspunkte für die absolute Reinheit der Culturen. Bald nach dem Sichtbarwerden der Pünktchen in der Gelatine müssen dieselben ganz gleiches Aussehen zeigen, wodurch eben die Gleichartigkeit der vorhandenen Pilze erwiesen wird. Erst später dürfen dann gewisse Verschiedenheiten eintreten, indem z. B. die an der Oberfläche der Gelatine liegenden Colonien unter dem Einflusse des Sauerstoffs rascher wachsen. Bringt man jedoch einen Theil einer solchen different aussehenden Colonie von Neuem in Nährgelatine zur Aussaat, so müssen wieder mit den früheren ganz gleichartige Pünktchen entstehen, unter denen erst nach einiger Zeit dann wieder die oberflächlich liegenden sich viel grösser ausbilden. Auf diese Weise wurde die Reinheit der Culturen in A, B und C sicher erwiesen.

Der 2. Theil der Tabelle III führt die bei den Versuchen am Anfang vorhandene Pilzmenge, also die Aussaat, und die bei Unterbrechung derselben anwesende auf. Hieraus lässt sich die Anzahl der Generationen in jedem Falle berechnen, wir haben während 29 Stunden bei A (Sauerstoff) 7—8 Generationen, bei B (Wasserstoff) 4—5, bei C (Controlversuch) 5—6 Generationen.

Um auf die Gährthätigkeit des einzelnen Pilzes schliessen zu können, ist es nöthig, die Zahl der durchschnittlich thätigen Pilze zu kennen. Den besten Näherungswerth hierfür gibt uns das arithmetische Mittel aus Pilzmenge am Anfang und am Ende. Setzen wir diese Zahl für den Versuch mit Sauerstoff (A) = 100, so ist sie für B (mit Wasserstoff) = 13,5, für C (Controlversuch) = 31,2.

Kohlensäurebestimmung.

Die Bildung von Kohlendioxyd sollte nur bei Versuch A und B verfolgt werden. Die hierzu verwendeten Apparate sind bereits beschrieben worden. Bei Abnahme derselben wurde die Kohlensäure aus den ersten Trockenapparaten noch durch Sauerstoff, bezw. Wasserstoff in die Absorptionsapparate gedrängt und in der üblichen Weise schliesslich trockene, CO₂-freie Luft durchgesaugt. Die Wägung der Apparate führte zu folgenden Ergebnissen:

Kohlensäureproduktion bei A (mit Sauerstoff) 0,6682 gr.

Kohlensäureproduktion bei B (mit Wasserstoff) 0,3925 gr.

Oder setzen wir die bei A entstandene Menge = 100, so ist sie für B = 58,7. Es muss darauf hingewiesen werden, dass der weitaus grösste Theil der Kohlensäure nicht bei der Gährung direkt entstanden ist, sondern erst durch die gebildeten Fettsäuren aus dem zur Neutralisirung beigegebenen Calciumcarbonat freigemacht wurde.

Resultate.

Stellt man die Ergebnisse zusammen, indem man die gefundenen Zahlen beim Sauerstoffversuch immer = 100 setzt, so erhalten wir folgende Tabelle.

Resultate (Tabelle IV).

	Mittlere Pilzzahl.	Vergohrenes Glycerin.	Kohlendioxyd.
A (Sauerstoff.)	100	100	100
B (Wasserstoff.)	13,5	64,8	58,7
C (Controlversuch)	31,2	72,6	—

Hieraus ergibt sich:

1. Die Vermehrung des *Bacterium Fitz.* wird durch die Anwesenheit freien Sauerstoffs ganz wesentlich begünstigt. Die Zahlen in Tabelle III geben dafür noch nicht einmal den richtigen Ausdruck, da sich die Lebensbedingungen für die Pilze beim Sauerstoffversuch bald schlechter als bei dem mit Wasserstoff gestalteten. (Anhäufung von Zersetzungsprodukten, Nahrungsmangel).

2. Bei gleich grosser Aussaat wird in der nämlichen Zeit mehr Glycerin vergohren, wenn Sauerstoff vorhanden ist, als ohne denselben. Obwohl die Aussaat zu Ungunsten dieser Verhältnisse etwas verschieden waren, verhalten sich die Mengen des vergohrenen Glycerins doch wie 3:2.

3. Die Bildung von Kohlensäure, welche das Maass für sämtliche Oxydationsvorgänge abgibt, bleibt im Verhältniss zum vergohrenen Glycerin annähernd gleich gross, wird Sauerstoff oder Wasserstoff zugeleitet.

4. Die Gährthätigkeit, berechnet auf den einzelnen Pilz, ist bei Anwesenheit freien Sauerstoffs geringer als bei Abwesenheit desselben. Pedersen hat, wie erwähnt, bei Bierhefe dasselbe Resultat erhalten. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass die nachtheilige Veränderung der Nährlösung bei A (mit Sauerstoff) viel bedeutender gewesen sein wird, als bei B (mit Wasserstoff); die schädliche Anhäufung von Gährungs- und

Ausscheidungsprodukten war grösser, der Vorrath an Nahrungsmitteln bald geringer, ferner der Glyceringehalt vermindert, was bei solch' geringem Procentsatz an Glycerin auch ungünstig für die Gährthätigkeit sein dürfte. Indess halte ich diese Versuchsfehler nicht für ausreichend, um die Resultate wesentlich zu beeinträchtigen, umsomehr als sie zum Theil dadurch compensirt werden, dass die der Berechnung zu Grunde liegende «mittlere Pilzzahl» gerade beim Sauerstoffversuch hinter der wirklich in der Zeiteinheit thätigen Menge jedenfalls zurückbleibt; bei A fand am Anfang eine ausserordentlich rasche Pilzvermehrung statt, während sie bei B gleichmässiger über die Versuchsdauer vertheilt gewesen sein wird.

Für Sprosshefe hat Nägeli bei Ausschluss der Vermehrung die Erhöhung der Gährthätigkeit der einzelnen Zelle nachgewiesen. Wir dürfen kaum bezweifeln, dass es sich bei Spaltpilzen ebenso verhält.

Vielleicht gelingt es einmal, den direkten Nachweis zu führen. Dann wäre bezüglich der Gährthätigkeit ein Unterschied zwischen rasch wachsender und langsam wachsender Zelle zu machen. Die rasch wachsende, lebhaft assimilirende Zelle würde sich dann bezüglich der Gährthätigkeit minder leistungsfähig zeigen, als die zwar lebenskräftige, im Augenblick aber in geringerem Stoffumsatz begriffene, langsam wachsende Zelle, eine Vorstellung, die physiologisch gewiss nicht undenkbar erscheint.

Diese Arbeit wurde im pflanzen-physiologischen Institut des Herrn Professor von Nägeli ausgeführt und sage ich hier für Ueberlassung der Apparate meinen verbindlichsten Dank.