

# 1 . Zur Biologie der normalen Milchkothbacterien.

Von

**Dr. Adolf Baginsky.**

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts in Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 9. April 1888.)

Die bacteriologische, nach den modernen und exacten Koch'schen Züchtungsmethoden gewonnene Kenntniss der in normalen Milchfäces der Kinder vorkommenden Microorganismen ist durch Escherich's<sup>1)</sup> werthvolle Untersuchungen geschaffen worden. Es ist Escherich so wenig wie früheren Untersuchern entgangen, dass in den normalen Milchfäces eine grosse Reihe verschiedener Bacterienformen vorkommen: es gelang ihm, von diesen, als constante und stets wiederkehrende Formen, zwei zu isoliren, die er unter der Rubrik der obligaten Milchkothbacterien mit den Namen *Bacterium lactis aërogenes* und *B. coli commune* belegte.

Die biologisch-chemischen Untersuchungen, welche mit diesen beiden Microorganismen ausgeführt wurden, führten im Wesentlichen zu dem Ergebniss, dass *B. lactis aërogenes* (unter Gasbildung) eine ausgiebige Spaltung des Zuckers bei geringerem Eiweissconsum zukommt, während *B. coli commune* weder auf den einen noch auf den andern Nährstoff besondere Einwirkung zeigte. Beide Bacterienarten bringen, das erstere rascher und intensiver, das letztere langsamer und

1) Escherich, Die Darmbacterien des Säuglings. Stuttgart 1886, bei Ferdinand Enke.

mit nicht so massigem Niederschlage, die steril gemachte Kuhmilch unter Säurebildung zur Gerinnung. Die von *B. lactis* gelieferte Säure wird als Milchsäure angesprochen, so dass das Bacterium auch den Namen des Milchsäurebacillus oder Darmmilchsäurebacillus erhält.

Schon seit längeren Jahren mit den pathologischen Processen im kindlichen Darmtractus beschäftigt, schien es mir von Wichtigkeit, einmal die bacteriologischen Untersuchungen Escherich's nachzuprüfen, vor Allem aber die von ihm aufgedeckten biologisch-chemischen Wirkungen der genannten Bacterien zu untersuchen, in der Hoffnung dabei auch über gewisse pathologische Vorgänge, welche in dem kindlichen Darmtractus ablaufen, Aufklärung zu erhalten.

Die nachfolgenden Untersuchungen sind derart angestellt, dass zunächst aus normalen, und unter aseptischen Cautelen aus dem Darm von Brustkindern entnommene Fäces nach Koch'scher Methode Plattenculturen angelegt, von den Platten die Bacterien in Reinculturen auf Fleischpeptongelatine, Agar-Agar, Kartoffeln gezüchtet wurden und dass diese so gewonnenen reincultivirten Bacterien zur biologisch-chemischen Untersuchung genommen wurden.

Bringt man eine geringe Menge von normalem Milchkoth in Fleischpeptongelatine, unter Anwendung der üblichen Verdünnungen auf die Glasplatten, so ist folgende sich in jedem Falle wiederholende Beobachtung zu machen. Während die Platten zweiter, dritter u. s. w. Verdünnung ausschliesslich festlassende Colonien zeigen, beobachtet man auf der ersten Platte eine überaus rasche, oft und augenscheinlich von kleinsten Kothpartikelchen ausgehende, doch auch sonst sich bemerklich machende Verflüssigung der Gelatineplatte. Es kann sich hierbei, wie die anderen Platten erweisen, nicht um eine von wachsenden Bacteriencolonien ausgehende Wirkung handeln, vielmehr kommt die Wirkung eines ungeformten Fermentes zur Geltung, welche in den hochpotenzirten Verdünnungen der anderen Platten zum Verschwinden gebracht

ist. v. Jaksch<sup>1)</sup> hat erst kürzlich darauf hingewiesen, dass sich in den Fäces von Kindern ein saccharificirendes Ferment vorfindet, und es als zweifelhaft hingestellt, woher dasselbe stamme; da es sich bei der Verflüssigung der Fleischpepton-gelatine augenscheinlich um ein peptonbildendes (eiweiss-lösendes) Ferment handelt, welches bei alkalischer Reaction in Wirksamkeit tritt, so liegt nichts näher, als beiden Fermentarten diejenige Quelle zuzuweisen, von welcher dieselben bekanntermassen gemeinschaftlich fliessen, d. i. das Pancreas; augenscheinlich hat man es mit Resten des den Fäces beigemischten Pancreassaftes zu thun.

Auf den anderen Platten wachsen, wie erwähnt, ausschliesslich festwachsende Colonien, in einzelnen Fällen ausschliesslich von ein und derselben Bacterienart, wie wenn eine Reincultur ausgesäet worden wäre, in anderen findet man neben mehr zufälligen oder seltener wiederkehrenden Formen vorzugsweise die von Escherich beschriebenen, als obligate Milchkothbacterien bezeichneten Formen neben einander, welche bei erlangter Uebung und Kenntniss durchaus unschwer von einander zu trennen sind. Es können des Weiteren die bacteriologischen Befunde hier übergangen werden, da ich in einer späteren bacteriologischen Arbeit auf dieselben zurückzukommen beabsichtige, soweit aber die zwei hier in Rede stehenden Bacterienformen in Frage kommen, im Wesentlichen nur die von Escherich angeführten Thatsachen bestätigt werden können; nur das mag erwähnt sein, dass bei der ausserordentlichen Aehnlichkeit der beiden Bacterienarten in ihrem Verhalten in Gelatine- und Agarculturen gerade die Kartoffelculturen sehr geeignet sind, die beiden Formen von Microorganismen auseinander zu halten.

Die nachfolgenden Untersuchungen beschäftigen sich nur ausschliesslich mit dem als *B. lactis aërogenes* oder Dararmilchsäurebacillus bezeichneten Microorganismus, während ich mir vorbehalte, die über *B. coli* eingeleiteten Untersuchungen später mitzutheilen.

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XII, S. 118 ff.

Der allgemeine Gang der Untersuchungen war folgender. Aus den gewonnenen Reinculturen, in der Regel von der Gelatinecultur aus dem Reagensglas, aber auch wohl von Agar-Agar- und von Kartoffelculturen wurde auf die; in vorher steril gemachten Kolben gefüllten, durch 3 Tage hinter einander je  $\frac{1}{2}$ —1 Stunde im Wasserdampfstrom sterilisirten Nährlösungen geimpft. Die Gärung wurde bei 35—37° C. eine gewisse, angemessene, je nach dem Versuch variierte Zeit unterhalten. Vor der Untersuchung der gelieferten Gährungsproducte wurde jedes Mal ohne Ausnahme durch Gelatineplattencultur das Reingebliensein der Gährculturen geprüft und selbstverständlich irgend verunreinigte oder auch nur verdächtige Versuche verworfen. Da mir bei dieser Studie practische Ziele vor Augen standen, so sind als Nährmedien vorzugsweise solche Substanzen verwendet worden, welche bei der Kinderernährung eine Rolle spielen; auch sind, wie man in dem Folgenden finden wird, die Versuchsbedingungen mit Rücksicht auf die im lebenden Darmkanal des Kindes vorhandenen, uns bekannten Verhältnisse variiert worden, um so einen möglichst klaren Einblick in die Wirkungen zu erhalten, welche das Bacterium bei der Verdauung im kindlichen Darmtractus auszuüben vermag.

### I. Wirkung des *B. lactis* (Escherich) auf Milchzucker.

1. 5 gr. Milchzucker wurden in einem vorher bei 140° C. sterilisirten Kölbchen in 50 ccm. steril gemachten destillirten Wasser gelöst, eine geringe Menge Pepton hinzugesetzt und das Ganze unter Watteverschluss im Dampfstrom in 3 auf einander folgenden Tagen je  $\frac{1}{2}$ —1 Stunde sterilisirt. Die Zuckerlösung nimmt hierbei eine braune Farbe an.

Am 3. Tage mit *B. lactis* geimpft und in den auf 37° C. gehaltenen Brütöfen gebracht.

Am folgenden Tage schon ist die Flüssigkeit trüb, zahlreiche Gasblasen auf derselben. Die Trübung bleibt in den folgenden 4 Tagen bestehen, während die Gasentwicklung aufzuhören scheint.

Am 5. Tage zur Untersuchung genommen. Die Reaction ist sauer, u. z. entspricht die Säure in den 50 cbcm. Flüssigkeit = 1,7 cbcm. Normalnatronlauge. Die Flüssigkeit wurde mit Schwefelsäure versetzt, mit Aether ausgeschüttelt. Der Aether abdestillirt, der Rückstand mit Zinkoxyd in Wasser gekocht, filtrirt, eingedampft, zur Krystallisation hingestellt. Es scheiden sich keine Krystalle von milchsaurem Zinkoxyd aus, indess giebt der glasige, auf dem Uhrglas befindliche Rückstand mit Eisenchlorid und Phenol die zeisiggelbe Reaction, welche der Milchsäure zugeschrieben wird. Jedenfalls ist die Menge der gebildeten Milchsäure nur ganz unbedeutend.

2. Dieselbe Versuchsanordnung. (5 gr. Milchzucker : 50 Ag.) Untersuchung der Nährlösung am 6. Gährungstage.

4,4 cbcm. Normal-Natronlauge entsprechen der Acidität von 50 cbcm. Nährlösung.

Die Gährflüssigkeit wurde neutral der Destillation unterworfen. Im Destillat erhält man mit Jodjodkalium und Natronlauge einen gelben, nach Jodoform riechenden Niederschlag, der in Aether aufgenommen nach Abdunsten des Aethers deutlich die Krystallisationsform des Jodoform zeigt.

Der Versuch mit Nitroprussidnatron und Natronlauge, die Acetonreaction zu erhalten, glückt nicht, auch löst das Destillat kein frisch gefülltes Quecksilberoxyd. Die gebildete, in das Destillat übergegangene Substanz ist jedenfalls kein Aceton; der Versuch, durch die Benzoylchloridreaction Aethylalkohol nachzuweisen, fällt indess ebenfalls nicht sicher aus. Die gebildete Menge ist im Ganzen sehr gering.

Der nach der Destillation verbliebene Rest wurde wieder mit Schwefelsäure angesäuert und der Versuch gemacht, das Zinksalz etwa gebildeter Milchsäure darzustellen, mit etwas besserem Resultat, wie in dem ersten Versuch; es wurden einige Krystalle gewonnen, die mikroskopisch als milchsaures Zink angesprochen werden müssen, indess ist ihre Menge ganz unbedeutend: jedenfalls ist auch dieses Mal nur sehr wenig Milchsäure gebildet worden.

3. Dieselbe Versuchsanordnung in 2 Kölbchen. Zur Untersuchung genommen am 20. Tage der Gährung. Die Plattenculturen, welche zur Prüfung der Reincultur angelegt werden, bleiben steril. Die Bacterien sind also während des Versuches abgestorben. Die Aciditätsbestimmung ergibt:

in Kölbchen 1. 2,2 ccm. Normal-Natronlauge = 50 ccm. Gährflüssigkeit,

in Kölbchen 2. 2,1 ccm. Normal-Natronlauge = 50 ccm. Gährflüssigkeit.

Bei der Destillation der neutral gemachten Gährflüssigkeit giebt das Destillat folgende Reactionen:

Mit Jodjodkalilösung und Natronlauge wird Jodoform gebildet. (Lieben's Reaction.)

Mit frisch gelöstem Nitroprussidnatron und einer geringen Menge Natronlauge entsteht eine rothe Farbe, die rasch sich in gelbbraunliche wandelt, durch Zusatz von Essigsäure indess für einen Augenblick wieder herzustellen ist. (Probe von Legal auf Aceton.)

Frisch gefälltes Quecksilberoxyd wird von dem Destillat gelöst und ist in der Lösung durch Schwefelammonium nachweisbar. (Probe von Reynold.)

Alle diese Reactionen stimmen für die Eigenschaften des Aceton und beweisen die Anwesenheit wenigstens geringer Mengen dieses Körpers.

In dem auf 200 ccm. gebrachten Rückstand nach beendetem Destillat aus beiden Kölbchen wurde die noch vorhandene Zuckermenge durch Titiren mit Fehling'scher Lösung bestimmt. Es wurde gefunden Zucker = 2,18, was, da 10 gr. Zucker zur Gährung gebracht worden sind, 7,82 gr. Verlust durch Gährung oder 78,2% entsprechen würde.

Nach der Zuckerbestimmung wurde der Rest der Flüssigkeit wieder in der schon angegebenen Weise auf Milchsäure untersucht. Es gelang nicht, Krystalle von milchsaurem Zink zu erhalten. Auf dem Uhrglase verblieb eine geringe Menge

einer glasigen, bräunlichen Substanz, welche mit Phenol-Eisenchlorid eine gelbe Farbe gab, die auf Milchsäure hinweist, indess ist die gebildete Menge sehr unbedeutend.

Aus den bisher mitgetheilten Versuchen geht hervor, dass das Gährungsvermögen des *B. lactis* auf Milchzucker ein sehr beträchtliches und intensives ist. Die Vergärung erfolgt unter Bildung von einer Substanz, welche die Acetonreaction giebt, und unter Bildung von Säure, die sich bei dem Versuche der Darstellung des Zinksalzes nur zum geringsten Theile als aus Milchsäure bestehend herausstellte. Höchst bemerkenswerth ist das Absterben der Bacterien in den Nährlösungen, wenn die Gärung über eine gewisse Zeit hinaus unterhalten wird; diese Thatsache wird uns später noch zu beschäftigen haben.

Es war unter solchen Verhältnissen angezeigt, der Ermittlung der gebildeten Säure nachzugehen. Die folgenden Versuche, welche in dieser Absicht unternommen wurden, sind deshalb mit grösseren Mengen von Nährflüssigkeit angestellt. Wiewohl die bisher benutzte Nährflüssigkeit dem *B. lactis* augenscheinlich zuträglich war, so wurde doch, um ein möglichst gutes Gedeihen der Microorganismen zu erzielen, zu den vorzugsweise von Fitz<sup>1)</sup> erprobten, für die Bacteriengärung als erspriesslich gefundenen Nährsalzen zurückgegriffen und diese der, der Vergärung zu unterwerfenden Substanz hinzugesetzt; auch wurde der bisher schon angegebene, im Wesentlichen von Fitz benutzte Gang der Untersuchung festgehalten.

#### Bestimmung der bei Vergärung des Milchzuckers durch *B. lactis* (Escherich) gebildeten Säure.

4.	36 gr. Milchzucker	wurden in	750 gr. Aq. gelöst.
dazu	Pepton siccum	8	gr.,
	Dikaliumphosphat	1,60	
	Calciumchlorid	0,15	
	Schwefels. Magnesia	0,3	

1) Fitz, Berichte der deutsch. chemisch. Gesellschaft, Bd. 9, 11.

und eine entsprechende Menge Calciumcarbonat. Das Ganze wurde gut umgeschüttelt in 8 bei 140° C. vorher sterilisirten Erlenmeyer'schen Kölbchen vertheilt und unter Watterverschluss in 3 auf einander folgenden Tagen je 1 Stunde im Wasserdampfstrom sterilisirt, wobei starke Bräunung der Nährlösung eintrat. Es wurden nun die Kölbchen mit *B. lactis* geimpft und bei 37° C. in den Brütöfen gebracht.

Schon am folgenden Tage erscheint die Nährlösung in allen Kölbchen trüb und ziemlich reichlich Gasblasen auf der Oberfläche. Die Gärung wurde 9 Tage unterhalten. Am 10. Tage wurden aus den Kölbchen Plattenculturen so angelegt, dass die 3. Verdünnung je auf 1 Platte gebracht wurde. Dieselben ergaben in der Folge, dass durchaus Reineulturen von *B. lactis* in den Kölbchen vorhanden waren. Die Flüssigkeit wurde aus allen Kölbchen von dem Kalksalz abgossen, in einen gemeinschaftlichen Kolben gebracht; das Kalksalz mit heissem Wasser übergossen, aufgeköcht, filtrirt und das Filtrat ebenfalls in den gemeinschaftlichen Kolben gebracht. Die so gesammelte Flüssigkeit wurde mit Hilfe des Dampfstromes destillirt.

Es gehen in das Destillat geringe Mengen einer die Jodoformreaction gebenden Substanz über: bei nochmaligem Destillat gelingt es wohl, die Substanz soweit zu erhalten, als die Jodoformreaction deutlicher wird, indess ist die im Ganzen gewonnene Menge zu unbedeutend, um weitere Proben damit anzustellen. Es sind, wenn Alkohol und Aceton gebildet worden sind, jedenfalls nur ganz unbedeutende Mengen davon vorhanden.

Der Rest, welcher nach der ersten Destillation zurückgeblieben war, wurde mit HCl angesäuert, nunmehr lange Zeit und unter 5 Mal erneutem Aufgiessen von Wasser mittelst des Dampfstromes destillirt. Es gelingt aber trotz tagelanger Destillation nicht, ein ganz säurefreies Destillat zu gewinnen, also die ganze Menge der gebildeten Säure zu erhalten. Durch Prüfungen mit Silbernitrat wurde von Zeit zu Zeit festgestellt, dass in das Destillat nicht HCl mit übergerissen wurde.



Das gewonnene Destillat wurde mit Barytlösung schwach alkalisch gemacht, auf dem Wasserbade bis auf etwa  $\frac{1}{3}$  eingedampft, der überschüssige Baryt mittelst Kohlensäure entfernt: filtrirt, weiter eingedampft und erneut gebildete Häutchen von kohlensaurem Baryt durch Filtriren entfernt, und so schliesslich das Barytsalz der gebildeten Säure gewonnen. Es wurden so im Ganzen 1,8105 des Barytsalzes gewonnen, was indess aus dem oben angegebenen Grunde noch keineswegs die ganze Menge der gebildeten Säure darstellt.

Zur Barytbestimmung genommen . . . . .	0,5835,
Als Ba . CO <sub>3</sub> gefunden . . . . .	0,4422 = <b>52,68</b> % Ba.
Essigsäure verlangt . . . . .	<b>53,72</b> % Ba.

Es war damit schon wahrscheinlich, dass die gebildete Säure zum grössten Theile Essigsäure war.

Eine Controlanalyse ergab aus:

0,2624 des Barytsalzes = 0,1988 Ba . CO<sub>3</sub>, also wieder **52,68** % Ba.

Nach möglichster Entfernung der in das Destillat übergehenden Säure, die aber, wie angegeben, nicht völlig gelang, so lange man auch destillirte, wurde der Rest in folgender Weise zur Untersuchung auf Milchsäure verwendet. Derselbe wurde mit Soda alkalisch gemacht, ein sich bildender Niederschlag abfiltrirt, das Filtrat eingedampft, auf dem Wasserbade zur Trockne gebracht und der Rückstand mit absolutem Alkohol längere Zeit hindurch und mehrfach in kleinen Portionen extrahirt. Der Alkohol wurde durch Abdampfen entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen, mit Schwefelsäure angesäuert und mit Aether vielfach ausgeschüttelt. Aus dem Aetherauszug wurde nach dem Entfernen des Aethers versucht, das milchsaure Zinksalz darzustellen. Hierbei wurden nur ganz geringe Mengen von als milchsaures Zinkoxyd anzusprechenden Krystallen, deren Krystallform zum meist die, länglicher, abgestumpfter, in der Mitte ein wenig ausgebuchteter Säulchen darbot, gewonnen. Jedenfalls war die Menge des gewonnenen milchsauren Salzes sehr gering und die gebildete Milchsäure verschwindend klein.

gegenüber der grossen Menge der als Essigsäure anzusprechenden Säure.

5. Der Versuch wurde in der gleichen Weise wiederholt. Es wurden dieselben Mengen in der Nährlösung verwendet und in 10 kleinen Erlenmeyer'schen, vorher sorgfältig sterilisirten Kölbchen mittelst *B. lactis* zur Gährung gebracht. Die Gährung wurde 17 Tage unterhalten, indess mussten 4 Kölbchen, weil die Cultur durch einen Schimmelpilz verunreinigt war, verworfen werden. 6 Kölbchen waren rein geblieben und zur Untersuchung genommen.

Das erste Destillat aus der zusammengethanen Nährlüssigkeit ergab genau, wie in dem ersten Falle, die oben beschriebenen, dem Aceton zugehörigen Reactionen mit aller Schärfe; bei wiederholter Destillation des ersten Destillats wurde allerdings nur so wenig von dem als Aceton angesprochenen Körper gewonnen, dass eine weitere Untersuchung als die Anstellung der beschriebenen Proben nicht möglich war.

Nach dem Ansäuern wurden durch lange fortgesetztes Destilliren 4,2638 gr. des Barytsalzes gewonnen.

0.7657 wurden zur Bariumbestimmung genommen und ergaben . . . . .	0.5895 Ba.CO <sub>3</sub>	53.53% Ba.
Essigsäure verlangt. . . . .		53.72% Ba.

Nach dem oben beschriebenen Gange der weiteren Untersuchung wurden auch hier wieder nur geringe Mengen, durch die Krystallform wohl charakterisirten milchsauren Zinkoxyds gewonnen.

Nach Allem war somit höchst wahrscheinlich geworden, dass die Hauptmasse der aus der Gährung des Milhzuckers von *B. lactis* gebildeten Substanz aus Essigsäure bestand. Es wurden, um vielleicht durch wiederholte Destillation der gewonnenen Substanz zu noch besser übereinstimmenden Zahlen zu gelangen, die aus Versuch 4 und 5 übrig gebliebenen Mengen gelöst, das Barytsalz durch Schwefelsäure zerlegt, der schwefelsaure Baryt abfiltrirt und das saure Filtrat neuerdings der Destillation unterworfen.

Aus dem Destillat wurde neuerdings das Barytsalz dargestellt. Von diesem ergaben:

$$0,689 = 0,526 \text{ Ba} \cdot \text{CO}_3 = 0,36578 \text{ Ba} = 53,08 \%$$

Das so gewonnene gereinigte Salz zeigte überdies folgende Eigenschaften:

Mit Eisenchlorid gab eine in Wasser gelöste Probe eine dunkelrothbraune Farbe. Unter Zusatz von Alkohol und concentrirter Schwefelsäure entstand beim Erwärmen ein sehr deutlicher Geruch von Essigäther. Mit  $\text{Ag} \cdot \text{NO}_3$  entstand eine Trübung, die beim Erhitzen sich löste und beim Erkalten ein in feinen Nadeln sich ausscheidendes krystallinisches Silbersalz erkennen liess.

Nach den vorliegenden Zahlen und dem Verhalten gegen Reagentien kann kein Zweifel vorhanden sein, dass die Hauptmasse der bei der Gährung gebildeten Säure Essigsäure war; Milchsäure war nur in geringen Mengen entstanden.

#### Gährversuche ohne Sauerstoffzutritt.

Die bisherigen Versuche waren stets unter einfachem Watteverschluss der Gefässe angestellt, der Zutritt der atmosphärischen Luft demnach frei. Da es darauf ankam, festzustellen, welche Wirkung das aus den Milchfäces von Kindern gezüchtete Bacterium im Darmkanal selbst auf die dargebotene Nahrung ausübte, und alle Erfahrungen darauf<sup>1)</sup> hinweisen, dass im Darmkanal freier Sauerstoff überhaupt nicht vorhanden ist, so mussten die weiteren Versuche dahin abgeändert werden, dass der Zutritt von Sauerstoff zur Nährlösung vollkommen abgeschnitten wurde. Dies wurde in folgender Weise erreicht.

6. Ein grosser Kolben wurde mit einem fest und luftdicht schliessenden, doppelt durchbohrten Gummistopfen versehen, in beide Durchbohrungen ebenso luftdicht anschliessende Glasröhren eingesetzt, von denen das eine, welches bis nahe

<sup>1)</sup> Siehe die Auseinandersetzung darüber bei Escherich, l. c. S. 137 ff.; Hoppe-Seyler, Physiologische Chemie, S. 330 ff.

zu an den Boden des Gefässes reichte, oben doppelt U-förmig abgelenkt und in dem aufsteigenden Schenkel der Biegung zu einer Kugel ausgeblasen war, das andere Glasrohr, welches nur bis unter die Fläche des Gummistopfens reichte, war am unteren Ende einfach U-förmig abgelenkt und zu einer feinen Spitze ausgezogen. Die beschriebene kugelförmige Partie des ersten Rohres wurde mit Watte versehen und ein luftdicht anschliessendes Gummirohr aufgezogen, welches mit einem Quetschhahn luftdicht zu Verschluss gebracht werden konnte. Das zweite Rohr wurde in der Umbiegung mit einer kleinen Menge Quecksilber beschickt und auf die fein ausgezogene Spitze noch zum völlig sicheren Luftabschluss ein Bunsensches Kautschukventil aufgesetzt, um ein Zurückströmen von Luft zu verhindern. Bevor der Apparat zur Benutzung genommen wurde, wurden die Glasbestandtheile sammt der in die Kugel eingebrachten Watte bei  $140^{\circ}$  C. sterilisirt, alle Gummibestandtheile aber vorher ausgekocht.

Es wurde nun die aus dem Vorigen schon bekannte Nährlösung in das steril gemachte Gefäss eingebracht, in das zweite Rohr ein wenig Quecksilber eingeführt und der völlige Luftabschluss des Gefässes geprüft. Der so beschickte Kolben wurde mit der Nährlösung in 3 auf einander folgenden Tagen im Kochschen Dampfsterilisirungsapparat je 1 Stunde sterilisirt, wobei sich, wie immer, starke Bräunung der Nährflüssigkeit einstellte. Die so steril gemachte Nährflüssigkeit wurde bei rascher Oeffnung des Gummistopfens mit *B. lactis* geimpft, der Kolben wird luftdicht geschlossen und nunmehr durch das erste Rohr ein starker H-Ström, welcher vorher durch ein sterilisirtes, destillirtes Wasser geleitet wurde, um etwaige mitgerissene Spuren von Schwefelsäure zu entfernen, durch die Flüssigkeit so lange hindurchgeleitet, bis der Kolben vollständig mit H erfüllt war. Der Kolben wurde jetzt bei  $37^{\circ}$  C. in den Brüt-Ofen gebracht. Schon am folgenden Tage leichte Trübung der Nährflüssigkeit, die sich alsbald steigerte, während geringe Spuren von Gasblasen an der Oberfläche der Nährflüssigkeit erschienen. Weitere Veränderungen wurden in der Folge nicht beobachtet. Die Gärung wurde 20 Tage hindurch unterhalten.

Am 20. Tage wurde der Kolben geöffnet, Plattenculturen wurden angelegt, die in der Folge die Reinheit der Cultur erwiesen, die Flüssigkeit wurde abgegossen und der Destillation unterworfen. Die ersten Tropfen des Destillats gaben in wenig ausgiebiger Weise mit Jodjodkaliumlösung und Natronlauge Jodoform; zu weiteren Proben war kein Anlass vorhanden; da diese Reaction schon bei der nächsten Probe versagte. Es war also die die Jodoformprobe gebende Substanz nur in ganz geringer Menge gebildet worden. Des Weiteren wurde das Kalksalz der Nährlüssigkeit durch nochmaliges Aufkochen mit Wasser aufgenommen und zu der der ersten Destillation unterworfenen Flüssigkeit hinzugefügt, jetzt mit HCl angesäuert und destillirt, und das Barytsalz der übergehenden Säure dargestellt. Es wurden nach mehrtägigem Destilliren 5,323 des Barytsalzes gewonnen. Von demselben gaben:

0,6638 = 0,5925 Ba.CO <sub>3</sub> — 0,3494385 Ba —	52,64 % Ba.
Essigsäure verlangt . . . . .	53,72 % Ba.

Da die Reactionen mit Eisenchlorid, mit Alkohol und conc. Schwefelsäure durchaus dem Verhalten der Essigsäure entsprachen, mit Ag.NO<sub>3</sub> das in feinen Nadeln in der Kälte auskrystallisirende Silbersalz darzustellen war, so kann kein Zweifel vorhanden sein, dass wieder Essigsäure in der Hauptsache bei dem Gährungsprocesse gebildet worden war.

Nach Milchsäure wurde in dem Rückstande des Destillats nicht gesucht.

### Ausschluss von Sauerstoff und Zusatz von Galle bei dem Gährungsversuch.

War somit festgestellt, dass auch unter Ausschluss des Sauerstoffs das Bacterium — welches übrigens auf den Platten in ausserordentlich reichlichen Culturen aufschoss, somit sehr gut und reichlich in der Anaërobie gewachsen war — Essigsäure bildete, so war es weiterhin von Interesse, zu prüfen, welche Producte geliefert wurden, wenn die in dem Darmkanal vorhandenen Secrete oder wenigstens eins der wichtigsten derselben, die Gallenbestandtheile, gleichzeitig mit dem

Sauerstoffmangel zur Geltung kommen. In Ermangelung einer ausreichenden Menge von Galle aus kindlichen Cadavern wurde Kälbergalle verwendet.

7. Etwa 20 ccm. Galle wurde in einem Erlenmeyerschen Kölbchen durch 5 Tage je 5 Stunden im Wasserdampfstrom sterilisirt und durch vorherige Prüfung auf Gelatine und Agar-Agar als steril befunden. Die Versuchsanordnung blieb des Weiteren durchaus wie bei 6. Die Gährung wurde 26 Tage lang bei 37° C. im Brütöfen unterhalten. Nach Feststellung der erhaltenen Reincultur wurde die Gährflüssigkeit zur Untersuchung genommen.

Mit dem ersten Destillat konnten wieder die oben beschriebenen, dem Aceton zugehörigen Reactionen gewonnen werden, indess war auch hier die nachweisliche Menge nur so gering, dass dieselbe eben für die Reactionen ausreichte.

Nach Darstellung des Barytsalzes durch Destillation aus dem sauer gemachten Rückstande des ersten Destillats wurden folgende Zahlen bei Bestimmung des Bariumgehalts gewonnen:

Zur Untersuchung genommen . . . . .	0,0488.
Dieselben ergaben $0,8028 \text{ Ba.CO}_3 = 0,558267 \text{ Ba} =$	$53,22\%$ Ba.
Essigsäure verlangt . . . . .	$53,72\%$ Ba.

Die mit dem Barytsalz vorgenommenen Proben stimmten durchaus mit dem Verhalten der essigsäuren Verbindung.

Von Milchsäure wurden als Zinksalz weiterhin nur ganz geringe Mengen gefunden.

Die Gallenbeimischung hatte also in dem Vorgange der Zuckergährung unter Ausschluss des Sauerstoffs keinerlei Aenderung hervorgerufen, und es ist sonach mit grosser Wahrscheinlichkeit dargethan, dass auch in dem Darmkanal der Milchzucker unter dem Einflusse von *B. lactis* zum grössten Theile zu Essigsäure vergohren wird.

Die die Essigsäure stets begleitenden geringen Mengen von Milchsäure lassen es als nothwendig erscheinen, die Einwirkung des *Bacterium lactis* auf neutrale milchsaure Salze direct zu prüfen. Die Vorstellung war ja möglich, dass die Essigsäure erst als ein späteres Product der Gährung auftrat und aus der ursprünglichen Milchsäuregährung hervorgeht.

Um dies zu entscheiden, wurde folgender Versuch angestellt.

8. 10 gr. neutrales milchsaures Natron wurde in 1000 Aq. eingebracht.

An Nährsalzen geringere Quantitäten, als bisher genommen worden waren.

Pepton	2,5
Dikaliumphosphat	0,1
Calciumchlorid	0,02
Schwefels. Magnesia	0,02

und eine entsprechende Menge Calciumcarbonat. Das Ganze wurde in der üblichen Weise 3 Tage nach einander in einem Kolben sterilisirt und mit *B. lactis* geimpft. Die Gährung wurde 14 Tage bei 37° C. unterhalten, ohne dass anscheinend mit der Nährlösung wesentliche Veränderungen, als etwa eine geringe Trübung, vorgegangen wären. Die nach unterbrochener Gährung aus dem Kolben dargestellten Gelatineplatten zeigten, dass ein sehr üppiges Wachsthum des rein gebliebenen *B. lactis* stattgefunden hatte.

Das erste Destillat der Gährflüssigkeit ergab nur geringen und langsam entstehenden Jodoformniederschlag bei Zusatz von Jodjodkalium und Natronlauge. Zu weiteren Proben reichte die gering gewonnene Menge überhaupt nicht aus. Die aus dem, mit Salzsäure sauer gemachten Rückstand durch Destillation gewonnene Säure wurde in das Barytsalz verwandelt und darin die Ba-Bestimmung gemacht. Dieselbe ergab Folgendes:

0,4622 des Barytsalzes ergaben an Ba.CO <sub>3</sub> = 0,2954	
— 0,20542116 Ba . . . . .	= 44,44% Ba.
Buttersäure verlangt . . . . .	43,703% Ba.

Es ist damit höchst wahrscheinlich gemacht, dass die aus der Gährung des milchsauren Salzes hervorgegangene Substanz zum grössten Theile aus Buttersäure bestand.

Auffällig war, dass beim Destilliren der mit HCl sauer gemachten Gährflüssigkeit die kochende Flüssigkeit eine sehr schöne Orangefarbe annahm, welche erst nach langem Kochen wieder verschwand. Es ist nach diesem Versuche nicht

wahrscheinlich gemacht, dass die Essigsäurebildung, welche durch Einwirkung von *B. lactis* auf Milchzucker statt hat, von Hause aus mit einer reichlichen Bildung von Milchsäure einhergeht, vielmehr scheint die Essigsäure direct bei der Vergärung des Milchzuckers zu entstehen.

## II. Wirkung des *B. lactis* (Escherich) auf Amylum.

1. 20 gr. zuckerfreies Amylum wurden mit 400 cbcm. Aq. zu Stärkekleister gekocht und je 50 cbcm. des Kleisters in ein vorher bei 140° C. sterilisirtes Erlenmeyer'sches Kölbchen eingebracht. So wurden 7 Kölbchen beschickt. In 3 derselben wurde überdies je 1,0 gr. Pepton sicc. eingebracht. In 2 anderen wurde dem Kleister je 10 cbcm. einer aus-

schwefelsaurem Ammoniak	1	}	100 Aq.
phosphorsaurem Kali	1		

bereiteten Nährlösung hinzugefügt.

2 Kölbchen verblieben als Controle.

Die so beschickten Kölbchen wurden sämmtlich unter Watteverschluss in 3 auf einander folgenden Tagen je 1 Stunde im Wasserdampfstrom sterilisirt. Nach der Sterilisation wurden den beiden Controlkölbchen Proben des Kleisters entnommen und mit Fehling'scher Lösung auf Zuckergehalt geprüft. Es war unter dem Einfluss der Sterilisation kein Zucker aus dem Amylum gebildet worden. Die 3 ersten und die 2 anderen Kölbchen wurden jetzt mit *B. lactis* geimpft. Die 2 letzten blieben ungeimpft und steril. Sämmtliche Kölbchen wurden bei 37° C. in den Brütöfen gebracht.

Am 4. Tage ist in keinem der Kölbchen an entnommener Probe mittelst Fehling'scher Lösung Zucker nachweisbar. Die Reaction in den ersten beiden Gruppen von Kölbchen ist sauer, die Reaction in den steril gelassenen Kölbchen neutral.

Es hat also in den beiden Gruppen der mit *B. lactis* geimpften Kölbchen keine Zuckerbildung aus Amylum stattgefunden, aber eine freie Säure ist nachweisbar geworden.



Nach weiteren 4 Tagen ist der Befund genau der gleiche, und ebenso nach weiteren 14 Tagen. Es wurde nun aus den ersten beiden Gruppen (5 Kölbchen) die gebildete Säure untersucht.

Es ergaben 0,1144 des Barytsalzes = 0,0890 Ba. CO<sub>3</sub>  
 = 0,0618906 Ba . . . . . = 54,1 % Ba.  
 Essigsäure verlangt . . . . . 53,72 % Ba.

Es ist sonach zum grössten Theile wieder Essigsäure gebildet worden, die überdies durch das Verhalten gegen Eisenchlorid und salpetersaures Silber sich ganz deutlich und in vollkommen charakteristischer Weise zu erkennen giebt.

Bemerkenswerth ist nach diesem Versuche die Bildung der Essigsäure aus Amylum, ohne dass es gelang, eine zuckerbildende Wirkung des *B. lactis* nachzuweisen. Gelegentlich seiner Versuche über *B. subtilis* giebt Fitz<sup>1)</sup> an, dass dieses Bacterium im Stande ist, sehr energisch aus Stärke Buttersäure zu bilden; er will deshalb dieses Bacterium sogar zur Darstellung der Buttersäure aus Amylum verwendet wissen. Die Wirkung des *B. lactis* ist, wie man erkennt, eine andere, und dieser Unterschied in dem biologischen Verhalten der beiden Bacterienformen ist nicht der einzige, vielmehr vermag *B. subtilis* nicht, wie dies von *B. lactis* erkannt worden ist, neutrales milchsaures Salz in buttersaures überzuführen.

Es war des Weiteren von Interesse, die Wirkungsweise von *B. lactis* auf Amylum unter Einfluss des Sauerstoffmangels zu studiren.

2. Unter sonstiger Belassung der Versuchsanordnung, wie dieselbe oben für die Anaërobiose beschrieben wurde, wurden

Amylum	10	: 1000 Aq.
Phosphors. Kalium	0,1	
Schwefels. Magnesia	0,02	
Pepton	5	
Calciumchlorid	0,02	

<sup>1)</sup> Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. XI, S. 51.

entsprechende Menge von Calciumcarbonat mit den schon bekannten Cautelen mit *B. lactis* zur Gährung bei 37° C. in den Brütofen eingebracht. Es erfolgte sichtbar keine Veränderung innerhalb 10 Tagen, so dass am 10. Tage eine zweite Impfung mit *B. lactis* vorgenommen wurde. Auch diese blieb anscheinend ohne Einwirkung auf die Nährflüssigkeit. 5 Tage nach der zweiten Impfung wurden Platten-culturen angelegt, welche ergaben, dass die Cultur rein geblieben war und ein reichliches Wachstum der Bacterien stattgehabt hatte: es waren auf den mit starken Ver-dunnungen geimpften Platten zahlreiche Colonien von *B. lactis* aufgegangen. Die Untersuchung der Nährflüssigkeit ergab Folgendes:

1. Zucker war nicht gebildet worden; die Probe mit Fehling'scher Lösung blieb erfolglos.

2. Die Reaction der Flüssigkeit war ganz schwach sauer.

3. In dem ohne Zusatz von HCl gewonnenen ersten Destillat bleibt die Lieben'sche Jodoformreaction völlig aus. Beim Destilliren mit HCl gehen in das Destillat nur ganz geringe Mengen einer Säure über, welche wohl die Reaction mit Eisenchlorid gestatten, und mit Wahrscheinlichkeit Essigsäure erkennen lassen. Die Menge des daraus gewonnenen Barytsalzes ist zu gering zu einer Ba-Bestimmung; dasselbe giebt indess mit  $\text{Ag. NO}_3$  feine Nadeln des essigsauren Silber-salzes. Es ist also in ganz kleinen Mengen Essigsäure gebildet worden. Der Nachweis von Milchsäure gelang nicht sicher, wiewohl einzelne Krystalle des Zinksalzes, welche dar-zustellen versucht wurden, mit einiger Wahrscheinlichkeit als milchsaures Zinkoxyd angesprochen werden konnten. Es war also bei diesem, mit Ausschluss des Sauerstoffs durchgeführten Versuche die Gährung ganz unbedeutend, wengleich aus-reichendes Wachstum der verimpften Bacterien stattgefunden hatte, und es scheint sonach, wie wenn das Bacterium nur unter dem Einfluss des Sauerstoffs eine Gährwirkung auf *Amylum* auszuüben vermöge, während dieselbe bei Ent-ziehung des Sauerstoffs ausbleibt. Indess ist festzuhalten,

dass es weder in diesem noch in jenem Falle gelungen ist, durch Einwirkung von *B. lactis* auf Amylum Zucker zu erhalten.

### III. Einwirkung von *B. lactis* auf Casein und auf Milch.

Die Complicirtheit der Gährungsvorgänge in der Milch liess es wünschenswerth erscheinen, zunächst die Einwirkung des Bacterium auf Casein für sich allein zu studiren.

1. Von der Bolle'schen Molkerei in Berlin wurde ich in den Besitz eines fettfreien, harten und körnigen Caseins gesetzt, welchem allerdings noch reichlich Milchzucker anhaftete. Das Präparat wurde fein zermalen, mehrmals mit heissem Wasser ausgekocht und abgepresst. Es gelang aber hierbei dennoch nicht, den Zucker völlig zu entfernen. Von diesem Casein wurden je 20 gr. in ein vorher sterilisirtes Erlenmeyer'sches Kölbchen eingebracht und 8 Kölbchen beschickt. In 5 der Kölbchen wurde das Casein mit je 20 cem. einer Nährlösung befeuchtet, welche

0,2 Kaliumphosphat,  
0,04 schwefels. Magnesia,  
0,02 Calciumchlorid

enthielt. In 3 Kölbchen wurden je 20 cem. Aq. auf das Casein gebracht.

Die Kölbchen wurden sämtlich im Koch'schen Sterilisationsapparat 3 Tage nach einander je 1 Stunde sterilisirt, wobei sich der Zuckergehalt des Casein durch starke Bräunung des Präparates zu erkennen gab.

3 mit Nährlösung befeuchtete Kölbchen und die 2 mit destillirtem Wasser befeuchteten wurden mit *B. lactis* geimpft. Die 2 anderen mit Nährlösung befeuchteten wurden steril gelassen zur Controle. Die Kölbchen wurden sämtlich bei 37° C. in den Brütöfen gebracht, wo sie 21 Tage verblieben. Es zeigte sich an dem Nährmaterial während dieser Zeit nicht die geringste Aenderung. Am 21. Tage wurden Impfungen auf Fleischpeptongelatine gemacht, — ohne Erfolg, die Röhrchen blieben steril. Die Bacterien waren während des Ver-

suches abgestorben. Die Reaction war indess intensiv sauer geworden, während die Controlkölbchen neutrale Reaction hatten. Die Kölbchen wurden jetzt neuerdings mit einem anderen, aus pathologischen Kinderfäces gezüchteten verflüssigenden Bacillus geimpft und 3 Tage bei 37° C. im Brüt-Ofen belassen. Nochmalige Impfung auf Gelatineröhrchen ergab, dass auch die neue Cultur nicht angegangen war, die Gelatine-röhrchen blieben steril. Das Casein der geimpften und der Gährung ausgesetzten Kölbchen wurde mit heissem Wasser ausgezogen und die saure Lösung destillirt. Im Destillat war mit Millon's Reagens keine auf Phenol oder Kresole hinweisende Reaction nachweisbar; auch auf Zusatz von Bromwasser erfolgte keine Reaction. Irgend eine Art von Fäulniss-gährung im engeren Sinne, hatte sonach nicht stattgefunden, vielmehr war die intensiv saure Reaction augenscheinlich durch Einwirkung des *B. lactis* auf den, dem Casein noch anhaftenden Milchzucker entstanden. Bemerkenswerth ist, worauf ich noch zurückkommen werde, das Absterben der Bacterien in der sauren Lösung, welche durch die eigene Gährwirkung geschaffen ist, und das Unvermögen des aus pathologischen Fäces gezüchteten, leicht zu cultivirenden, «weissen verflüssigenden Bacillus», auf dem sauer gewordenen Nährboden zu keimen.

Es wäre nach dem mit dem Casein erhaltenen negativen Resultat von grossem Werthe gewesen, die Einwirkung des *Bacterium lactis* auf die Eiweisskörper der Milch in ihren einzelnen Phasen studiren zu können; leider sind die dahin gerichteten Versuche nicht in völlig wünschenswerther Weise ausgefallen. Trotz meiner durch meine früheren Arbeiten auf diesem Gebiete gewonnenen practischen Erfahrungen<sup>1)</sup> gelang es mir nicht, in der durch langes und mehrfaches Erhitzen steril gemachten Milch, mittelst der Hoppe-Seyler'schen Methode der Bestimmung der Eiweisskörper, in mehrfachen Controlbestimmungen zu so einheitlichen und gleichmässigen

1) S. Verwendbarkeit der durch Einwirkung hoher Temperaturen dargestellten Milchconserven. Archiv f. Kinderheilk., Bd. 4.

Zahlen zu gelangen, dass es angezeigt gewesen wäre, diese für Vergleichsbestimmungen mit der der Gährung mittelst *B. lactis* unterworfenen Milch zu verwenden. Die Schwierigkeiten, die sich ergeben, sind um so grösser, als unter der Einwirkung des *B. lactis* die Milch sehr rasch zu einem dicken Klumpen gerinnt, so dass ungeronnene und durch die Gährung zur Gerinnung gebrachte Milch mit einander verglichen werden mussten. Unter solchen Verhältnissen begnügte ich mich damit, die Gesamteiweisskörper der Milch nach der Ritthausen'schen Methode mit Kupfersulfat zu fällen, den Ueberschuss des Kupfersulfats durch Natronlauge zu entfernen und in den so gewonnenen Kupferverbindungen den Stickstoffgehalt zu bestimmen, in der Hoffnung, auf diesem Wege zu Vergleichszahlen zu gelangen, welche für die Frage, in wie weit die Eiweisskörper der Milch von *B. lactis* angegriffen werden, eine gewisse Entscheidung bringen würden. Es wurde überdies in den der Gährung unterworfenen Milchproben nach den Producten der Eiweissfäulniss, Phenol, Kresole, Leucin und Tyrosin, gesucht.

Diese Versuche wurden in folgender Weise ausgeführt:

2. In 2 vorher bei  $140^{\circ}$  C. steril gemachten Kölbchen wurden von derselben wohl durchgeschüttelten Milch je 50 cem. eingebracht. Die Milch wurde in beiden Kölbchen unter Watteverschluss in 3 auf einander folgenden Tagen je 1 Stunde im Wasserdampfstrom sterilisirt. Das eine der Kölbchen wurde mit *B. lactis* geimpft und das andere steril gelassen und beide in den auf  $37^{\circ}$  C. gehaltenen Brütöfen eingebracht. Nach 10 Tagen wurde die Milch in den steril gehaltenen Kölbchen, welche unverändert und nicht geronnen war, sich bei einer Impfproube auf Fleischpeptongelatine auch als steril erwies; mit der für die Ritthausen'sche Methode verwendeten Kupfersulfatlösung vollkommen ausgefällt und der Ueberschuss der Kupferlösung mittelst Natronlauge von der bekannten Concentration entfernt, filtrirt, der Kupferniederschlag getrocknet, gewogen und in einem Theile durch Verbrennung der N-Gehalt bestimmt. Es wurden gefunden

8,31% N und daraus der N in 1 gr. der zur Untersuchung genommenen Milch auf = 0,00460 berechnet.

Aus dem der Gährung unterworfenen Kölbchen wurde die Gesamtmenge der geronnenen Milch mittelst Wasser sorgfältig ausgespült und nach möglichst feiner Vertheilung die Fällung mit Kupfersulfat vorgenommen. Der Kupferniederschlag wurde wie der erste behandelt und ergab einen Gehalt von 5,75% N. Auf 1 gr. der vergohrenen Milch berechnet ergab dies einen N-Gehalt = 0,00446.

Das gewonnene Filtrat wurde schwach mit Essigsäure angesäuert der Destillation mit dem Wasserdampfstrom unterworfen. Das Destillat gab weder mit Millon's Reagens, noch mit Bromwasser irgend eine erkennbare Reaction. Phenol und Kresole fehlten also vollständig.

Der Rest wurde sodann mit essigsurem Quecksilberoxyd gefällt; der entstandene Quecksilberniederschlag, welcher das Leucin enthalten musste, wurde nach dem Absetzenlassen filtrirt, in Aq. aufgenommen, das Quecksilber durch Schwefelwasserstoff völlig entfernt, bis auf einen kleinen Rest eingedampft und zum Krystallisiren hingestellt. Es schied sich kein Leucin ab. Hätte bei der mitgetheilten Versuchsanordnung wohl auch ein geringer Theil der Entdeckung entgehen können, so ist das vollständige Fehlen dennoch durchaus bemerkenswerth.

Es ist sonach bei der Einwirkung des *B. lactis* auf die Milch nur ein minimaler Verlust von stickstoffhaltigem Material nachweisbar gewesen. Die Producte der Eiweissfäulniss wurden indess vollständig vermisst.

Analyse des bei der durch *B. lactis* eingeleiteten Gährung sich entwickelnden Gases.

4. Der folgende Versuch wurde mit Milch angestellt, welche absichtlich nicht mit absoluter Strenge steril gemacht worden war, sondern nur nach dem jetzt in der Praxis üblichen Verfahren in dem Soxhlet'schen Milchkochapparat abgekocht war. Nach den oben mitgetheilten Erfahrungen:

über die Einwirkung von *B. lactis* auf andere Bacterienarten konnte man erwarten, dass nach der Impfung mit *B. lactis* die etwa durch das Kochen nicht völlig vernichteten Bacterienkeime in der Milch nicht werden zur Wirkung kommen können, und es kam mir in diesem Versuche darauf an, die Milch möglichst so zu erhalten, wie sie in der Praxis selbst zur Verwendung kommt. Ich will dabei nicht unerwähnt lassen, dass es mir geglückt ist, Milch, welche im Soxhlet'schen Apparat nach der von dem Erfinder angegebenen Vorschrift abgekocht worden war, über 3 Wochen ungeronnen und durchaus frisch zu erhalten.

2 Flaschen der für den Soxhlet'schen Apparat in der Regel verwandten Grösse (von 150 ccm. Inhalt) wurden mit Milch bis an den Hals gefüllt, die Milch nach dem vorgeschriebenen Verfahren unter Anwendung von gut schliessenden, mit Glasstöpseln versehenen Gummistopfen gekocht. Das eine der Fläschchen wurde mit *B. lactis* geimpft, das andere zur Controle steril gelassen, beide in den Brütoven bei  $34^{\circ}$  C. eingebracht. Am 2. Tage ist die Milch in dem ersten, geimpften Fläschchen geronnen, der Glasstöpsel ist aus dem Gummistopfen herausgeschleudert worden; es hatte sonach lebhaftes Gasbildung stattgefunden. In dem 2. Fläschchen ist die Milch unverändert und dieselbe blieb auch unverändert durch 5 Tage; aus dem ersten Fläschchen wurde der immer neu eingesetzte Glasstopfen noch mehrmals herausgeschleudert. Am 6. Tage wurde in das 2. bisher anscheinend steril gehaltene Fläschchen an Stelle des Gummistopfens ein vorher bei  $140^{\circ}$  sterilisirtes gasableitendes Rohr luftdicht eingesetzt, das Fläschchen mit *B. lactis* geimpft und bei Zimmertemperatur so stehen gelassen, dass das sich entwickelnde Gas unter Quecksilber in einer völlig trockenen Bunsen'schen Absorptionsröhre aufgefangen wurde. Am 3. Tage nach der Impfung begann die Gerinnung der Milch und allmählig auch die Gasentwicklung, welche 4 Tage unterhalten blieb. Am 7. Tage wurde der Versuch abgebrochen und das gebildete Gas zur Analyse genommen, bei welcher ich mich der dankenswerthen Unterstützung des Herrn Professor Kossel zu erfreuen hatte. Dieselbe hatte,

nach der Bunsen'schen Methode ausgeführt, folgende Ergebnisse:

Anfängliches Volumen . . . . .	= 30,174 ccm. bei 0° und 1 m. Druck.
Nach der Absorption durch die Kalikugel . . . . .	= 23,45 » » 0° » 1 » . . .
Es ist also Kohlensäure gebildet worden . . . . .	= 6,724 » » 0° » 1 » . . .
Nach Umfüllung in das Eudiometer ist das Anfangsvolumen =	17,388 » » 0° » 1 » . . .
Nach Zuführung von Sauerstoff. =	42,0631 » » 0° » 1 » . . .

Es erfolgte durch die electrischen Funken Explosion.

Nach der Explosion . . . . .	= 28,014 ccm. bei 0° und 1 m. Druck.
Nach der Absorption durch die neuerdingseingeführte Kalikugel	= 25,967 » » 0° » 1 » . . .
Darnach berechnet sich in . . . . .	17,3880 » . . . . .
H <sub>2</sub> . . . . .	= 6,6367 » » 0° » 1 » . . .
CH <sub>4</sub> . . . . .	= 2,0470 » » 0° » 1 » . . .
Rest (X) . . . . .	= 8,7043 » » 0° » 1 » . . .

Die Analyse ergab sonach neben Kohlensäure eine gewisse Menge H und CH<sub>4</sub> und wir haben somit in *B. lactis* eines jener Bacterien gefunden, welches im Stande ist, unter Zerlegung des Milchzuckers in Essigsäure die Weitervergärung der Essigsäure zu CH<sub>4</sub> zu bewirken. Wir sehen somit den jüngst von Hoppe-Seyler<sup>1)</sup> ausgesprochenen Satz, «dass auch im Darne von Menschen und Thieren das Auftreten von Methan nicht allein auf Spaltung von Cellulose zu beziehen sei, sondern durch die zahlreichen in der Nahrung eingeführten Körper, die unter Bildung von Acetat durch die Fäulniss zerspalten werden, wesentlich mitbewirkt werde», durchaus erwiesen, und wir haben, indem wir nach der vorliegenden Untersuchung das im Darmkanal der Säuglinge erzeugte Gasgemenge wesentlich als aus CO<sub>2</sub>, H, CH<sub>4</sub> bestehend ansprechen dürfen, die Quelle dieser Gärung wohl fast ausschliesslich in dem Milchzucker der dargebotenen Milchnahrung gefunden und als einen der Gärungserreger das *B. lactis aërogenes* somit erwiesen.

1) Hoppe-Seyler, Zeitschr. f. physiolog. Chemie, Bd. 11, S. 567.  
Zeitschrift für physiologische Chemie. XII.



Nach Unterbrechung der Gasansammlung wurde mit den beiden in den Flaschen zur Untersuchung gewonnenen Milchmengen gemeinschaftlich in folgender Weise verfahren. Das gebildete Gerinnsel wurde durch Coliren entfernt und die etwas trübe graue Molke der Destillation mit dem Wasserdampfstrom unterworfen. In dem Destillat ergab weder Millon's Reagens, noch Bromwasser irgend eine für gebildete Phenol oder Kresole massgebende Reaction. Nach der Destillation wurde der verbliebene Rest in der Absicht, nach Leucin und Tyrosin zu untersuchen, unter Hinzufügung eines mit heissem Wasser gemachten Auszuges des Caseingerinnsels mit Phosphorwolframsäure und Schwefelsäure gefällt, vom Niederschlag abfiltrirt, der Ueberschuss der Phosphorwolframsäure und Schwefelsäure mit Barytwasser in der Wärme entfernt, der überschüssige Baryt durch eingeleitete Kohlensäure niedergeschlagen und filtrirt. Das so erhaltene Filtrat gab mit Millon's Reagens keine Reaction; dasselbe war also mit Wahrscheinlichkeit frei von Tyrosin, nichtsdestoweniger enthielt dasselbe eine gewisse Menge von N, wie sich durch eine nach der Kjeldahl'schen Methode ausgeführte Untersuchung einer kleinen Probe erweisen liess. Hält man diese Erfahrung mit der oben gelegentlich der Stickstoffbestimmungen bei der Milchgährung gewonnenen zusammen, so hat es den Anschein, wie wenn unter dem Einfluss des *B. lactis* auf die N-haltigen Bestandtheile der Milch die gewöhnlichen und bekannten Producte der Fäulniss nicht gebildet werden, dass die N-haltigen Körper im Ganzen nur minimal angegriffen werden, dass indess aus diesen geringen verbrauchten Mengen N-haltigen Materials Körper gebildet werden, welche sich gegen Phosphorwolframsäure ähnlich verhalten, wie die Amidosäuren, da sie durch dieselben nicht fällbar sind, dass sie indess dem Millon'schen Reagens gegenüber und gegen Bromwasser nicht das Verhalten zeigen, welches dem Tyrosin zukommt.

Es wird weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben müssen, nach diesen N-haltigen Producten zu suchen. Der Rest des Filtrats wurde mit essigsäurem Quecksilberoxyd gefällt. Der Niederschlag nach dem Abstehen in Aq. aut-

genommen, mit HS zerlegt, filtrirt, bis zur Krystallisation concentrirt, stehen gelassen. Es scheidet sich nach längerem Stehen kein Leucin ab. Also auch hier dasselbe Resultat wie oben.

#### IV. Andere biologische Eigenschaften des *B. lactis*.

Wie ich schon an anderer Stelle<sup>1)</sup> mitgetheilt habe, entwickelt das *B. lactis* während seines Wachsthuums sehr energisch reducirende Eigenschaften. Die gebildeten, die Reduction einleitenden Stoffwechselproducte diffundiren durch die Nährlösungen, auch wenn dieselben die Consistenz der Fleischpeptongelatine haben, auf weite Strecken und selbst durch Thoneylinder hindurch.

Auf Fleischpeptongelatine, welche in 10 cbcm. = 0,5 cbcm. einer  $\frac{1}{2}$  Normalnatronlauge entsprechenden Essigsäure enthält, wächst *B. lactis* nicht mehr. Das oben erwähnte Absterben der Culturen in den durch die eigene Gährwirkung sauer gewordenen ursprünglich zuckerhaltigen Nährlösungen erklärt sich auf solche Weise.

*B. lactis* ist aber im Stande, bei Darreichung von Milchzucker als Nährmedium anderen Bacterien das Aufkeimen unmöglich zu machen. Das oben erwähnte «weisse verflüssigende Bacterium», welches ich aus pathologischen Fäces gezüchtet habe, und welchem, wie nicht unwahrscheinlich, eine nicht unbedeutende pathogenetische Rolle bei gewissen Verdauungsstörungen der Kinder zukommt, gedeiht nicht auf dem ursprünglich zuckerhaltigen, von *B. lactis* zu saurer Gährung gebrachten Nährmedium. Bringt man *B. lactis* mit dem letzterwähnten Bacterium auf Gelatine, welcher ein Zusatz von Milchzucker gemacht, so wächst unter mächtiger Entwicklung von Gasblasen *B. lactis*, während die Verflüssigung der Gelatine, welche dem letztgenannten Bacterium sonst in ausgezeichneter Weise zukommt, überhaupt ausbleibt. Es ist dies ein für die Pathologie, wie mir scheinen will, ausserordentlich wichtiger Fingerzeig, weil er die Bedeutung

1) Verhandl. d. physiolog. Gesellschaft (9. December 1887) zu Berlin.

der von *B. lactis* eingeleiteten und unterhaltenen Stoffumsetzungen für anderweitige und insbesondere für feindselige Gährvorgänge im kindlichen Darmtractus darthut. Ich werde an anderer Stelle auf dieselben, deren Kenntniss und Werth übrigens auch Escherich nicht entgangen ist, zurückkommen. Dass auf der anderen Seite die intensive Gährwirkung des *B. lactis* auf Milchzucker bis zur Essigsäure- und Methan-gährung für die Pathologie Bedeutung gewinnen kann, wird leicht einleuchten und soll an dieser Stelle nur angedeutet werden.

Setzt man zu 10 ccm. Fleischpeptongelatine 0,5 ccm. Normalnatronlauge, so gedeiht *B. lactis* sehr üppig, ja wohl stärker, als sonst. Das Wachsthum nimmt aber schon beträchtlich ab, wenn auf 10 ccm. Gelatine 1 ccm. Normalnatronlauge verwendet ist.

Bei Verwendung von 2 ccm. NaO : 10 ccm. Gelatine findet nur noch ganz geringes Oberflächenwachsthum statt. Man wird schliessen können, dass auch erhebliche im Darmkanal der Kinder zur Wirkung kommende Alkalescenz das Wachsthum und Gedeihen von *B. lactis* hemmt.

Auf Zusatz von 0,05 Benzoessäure : 10 ccm. Gelatine erfolgt kein Wachsthum, geringes bei Borsäure- und Resorcinzusatz.

Auf Zusatz von 0,05 Jodoform : 10 ccm. Gelatine wenig behindertes Wachsthum.

Auf Zusatz von 0,05 Naphthalin : 10 ccm. Gelatine ausserordentlich reichliches Wachsthum unter starker Gasentwicklung.

Bei 0,05 Calomel : 10 ccm. Gelatine zeigt sich eine gewisse Menge des Calomel zu einer dunkelschwarzen Masse verändert, wahrscheinlich reducirt. Kein Wachsthum im Stichkanal, nur reichliches Wachsthum an der Oberfläche. Calomel behindert also unzweifelhaft bis zu einem gewissen Grade das Gedeihen des Bacterium. Nachdem Morax<sup>1)</sup> den

1) Zeitschrift f. physiolog. Chemie, Bd. 10, S. 325.

Nachweis geführt hat, dass Calomel bei gewöhnlicher Verdauung die Eiweissfäulniss im Darmkanal nicht behindert, und nachdem auf der anderen Seite die practischen Erfahrungen am Kinderkrankenbett uns alltäglich die hervorragende Bedeutung dieses Mittels gegenüber gewissen Formen von Kinderdiarrhöen kennen gelehrt haben, werden wir an der Hand der vorliegenden Erfahrung, dass Calomel das Wachstum und wohl auch die Wirkungsfähigkeit von *B. lactis* beschränkt, jetzt besseres Verständniss für gewisse Formen von Diarrhöen erhalten können. Wahrscheinlich ist die Calomelwirkung dort bedeutungsvoll, wo es sich um die pathogene Wirkung der von *B. lactis* allzu reichlich gebildeten Essigsäure handelt. Auf der anderen Seite wird sich aus der gewonnenen Erfahrung und vorzüglich aus dem Verhalten des *B. lactis* in zuckerhaltigen Nährlösungen, gegenüber den eigentlichen (verflüssigenden), Eiweissfäulniss bedingenden Bakterien, von denen oben die Rede war, verstehen lassen, warum wir, was Hirschler<sup>1)</sup> gefunden hat, im Stande sind, einer zu heftigen Fäulniss im Darmkanale durch Beigabe von Kohlehydraten zur Nahrung zu begegnen. Wir ermöglichen augenscheinlich, indem wir *B. lactis* und ähnliche wie dieses, auf Kohlehydrate wirkende Bakterien in möglichst geeignete und gute Lebensbedingungen bringen, jenen Wettstreit der Gährungserreger, in welchem die Eiweissfäulniss bedingenden Microorganismen unterliegen. Welche Tragweite alle diese Gesichtspunkte für die Fragen der einzelnen Formen der Kinderdiarrhöen haben, behalte ich mir vor, an anderer Stelle auseinanderzusetzen.

Ueerblicken wir die ganze Reihe der mitgetheilten Untersuchungen, so haben wir in *B. lactis aërogenes* (Escherich) ein Bacterium gefunden, welches den Milchzucker in ausgiebigster Weise, unter Bildung kleiner Mengen von Aceton, zu Essigsäure, und weiter zu Kohlensäure, Methan und Wasserstoff vergäht. Nur ganz geringe Mengen von Milchsäure sind bei dieser Gährung zu entdecken. Die neutralen milchsauren

1) Hirschler. Zeitschrift f. physiolog. Chemie, Bd. 10. S. 317.

Salze aber ist dieses Bacterium im Stande in buttersaure überzuführen, und das Bacterium reiht sich so den schon bekannten, von Pasteur und Fitz beschriebenen Buttersäurebildnern an. Auf Amylum wirkt das Bacterium nur unter Sauerstoffzufuhr ein, indess ist eine Zuckerbildung nicht zur Erscheinung gekommen, vielmehr erscheint auch hier directe Bildung von Essigsäure. Während ich in fast allen bisher erwähnten Punkten nur in so weit zu übereinstimmenden Resultaten mit denjenigen Escherich's gekommen bin, dass *B. lactis* eine intensive Gährwirkung auf Zucker hat, konnte ich durchaus bestätigen, dass eine der Eiweissfäulniss entsprechende Wirkung von dem Bacterium auf die stickstoffhaltigen Bestandtheile der Milch nicht ausgeübt wird, vielmehr fehlten, wengleich ein gewisser Verbrauch von N-haltigem Material statt hat, die Producte der Eiweissfäulniss vollständig. — Die hervorstehende Eigenschaft des Bacterium, Essigsäure zu bilden, veranlasst mich, für dasselbe den Namen *B. aceticum* vorzuschlagen, was um so zweckmässiger sein dürfte, als schon einige in der Milch vorkommende Bacterien den Namen *B. lactis* führen.