

Beiträge zur Biochemie der Mikroorganismen.

Von

Hartwig Franzen.

X. Mitteilung.¹⁾

**Über die Bildung und Vergärung von Ameisensäure durch
Bacterium coli commune.**

Von

Hartwig Franzen und Heinrich Kahlenberg.

(Mitteilung aus dem chemischen Institut der Universität Heidelberg.)

(Der Redaktion zugegangen am 6. Juni 1916.)

In einigen früheren Mitteilungen untersuchte der eine von uns gemeinschaftlich mit F. Egger²⁾ den quantitativen Verlauf der Ameisensäuregärung durch mehrere farbstoffbildende Bakterienarten. Es zeigte sich, daß die Werte sich nicht vollständig reproduzieren ließen, was auf eine Änderung des physiologischen Zustandes der Bakterien, bedingt durch ihre Weiterzucht auf künstlichen Nährböden, zurückgeführt werden konnte. Besonders unangenehm war diese Veränderlichkeit bei der Untersuchung des Nährwertes verschiedener Zuckerarten und Aminosäuren, da natürlich nur dann direkt vergleichbare Werte erhalten werden, wenn der physiologische Zustand längere Zeit unverändert bleibt.

Dieser störende Faktor konnte voraussichtlich ausgeschaltet werden, wenn die als Untersuchungsobjekt dienenden Bakterien vor jedem Versuch unter gleichen Bedingungen ihrem natürlichen Standort entnommen würden. Aus diesem Grunde wurde zunächst untersucht, ob die aus verschiedenen Standorten

¹⁾ 9. Mitteilung, Diese Zeitschrift, Bd. 90 (1914), S. 321.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 79 (1912), S. 177; Bd. 83 (1913), S. 226; Bd. 88 (1913), S. 73; Bd. 90 (1914), S. 311.

isolierten Stämme von *Bacterium coli commune* sich gegenüber Ameisensäure gleich verhielten.

Als Nährflüssigkeit diente wieder die von Hartwig Franzen und F. Egger¹⁾ bei der Untersuchung der drei farbstoffbildenden Bakterienarten verwendete. Bei der Bereitung des Nährbodens wurde nicht wie früher das gewöhnliche destillierte Wasser des Laboratoriums benutzt, da dieses unter Umständen Spuren von Kupfer enthalten kann; es wurde zur Reinigung noch einmal aus Glasgefäßen destilliert.

Die Gärungsversuche wurden in folgender Weise angesetzt: Von frischen Faeces wurde ein Stück von Haselnußgröße in ein steriles Reagenzglas mit Watteverschluß gebracht, im Laboratorium eine Öse voll in Nähragar verrührt, in der üblichen Weise weiter verdünnt, Platten gegossen und 24 Stunden bei 37° stehen gelassen. Von zwei Kolonien, die das Aussehen von Colikolonien hatten, wurden dann Strichkulturen angelegt, 24 Stunden bei 37° gehalten, von dem Bakterienmaterial je eine 2 mm weite Platinöse voll in zwei Reagenzgläser mit 10 ccm der Nährlösung (ohne Ameisensäure) eingetragen und 24 Stunden bei 37° gehalten. Mit je 5 ccm der so gewonnenen Kulturen wurden dann 20 Kolben²⁾ mit 95 ccm Nährlösung, die das gesamte ameisensaure Natron, aber nur 95% der sonstigen Salze enthielt, geimpft. Die Kolben waren dann mit 100 ccm Nährlösung der gewünschten Zusammensetzung und annähernd der gleichen Bakterienzahl beschickt. Die Kolben wurden dann in Ostwaldsche Thermostaten gestellt, nach 24, 48 usw. Stunden 4 Kolben herausgenommen und die Ameisensäure nach der früher angegebenen Methode bestimmt.

Es wurden also aus jedem Faecesmaterial 2 Colistämme isoliert und getrennt untersucht. Um sicher zu sein, daß die isolierten Kulturen auch wirklich *Bacterium coli commune* waren, wurden sie jedesmal einer eingehenden mikro- und makroskopischen Prüfung unterzogen.

Anfangs wurden Versuchsreihen mit einigen schon längere Zeit fortgezüchteten Colistämmen angesetzt, um das Ver-

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 79, S. 179, 1912.

²⁾ Chemiker-Ztg., 1911, Nr. 108.

halten des Bakteriums gegenüber dem Nährboden kennen zu lernen. Zunächst wurde ein von Král in Prag bezogener Stamm bei 27° untersucht.

Wir geben hier nur die Mittelwerte aus 4 verschiedenen Versuchsreihen. Das ausführliche Zahlenmaterial findet sich in der Dissertation¹⁾ des einen von uns.

Mittelwerte.

Nach	sind gebildet Ameisensäure
1 Tag	11,15 %
2 Tagen	9,44 %
3 „	8,05 %
4 „	7,85 %
5 „	5,85 %.

Unter den gewählten Bedingungen wird durch *Bacterium coli* zunächst eine erhebliche Menge Ameisensäure gebildet, dann setzt am zweiten Tage eine langsame Vergärung ein, welche bis zum fünften Tage anhält. Die Zahlen sind vielleicht so zu deuten, daß Ameisensäurebildung und -vergärung nebeneinander herlaufen; am ersten Tage überwiegt die Bildung, während der folgenden die Vergärung.

Derselbe Stamm wurde auch bei 37° untersucht.

Mittelwerte.

Nach	sind gebildet Ameisensäure
1 Tag	12,09 %
2 Tagen	10,79 %
3 „	10,66 %
4 „	10,52 %
5 „	7,50 %.

Das Gärungsbild ist bei 27° und bei 37° fast dasselbe. Die Menge der während des ersten Tages gebildeten Ameisensäure ist bei 37° etwas größer als bei 27°. Dagegen setzt die Vergärung bei 27° etwas kräftiger ein und schreitet auch rascher fort.

Weiter wurde eine Versuchsreihe mit einem aus dem pathologischen Institut der Universität Heidelberg bezogenen Colistamm bei 37° angesetzt.

¹⁾ Heinrich Kahlenberg, Über die Bildung und Vergärung von Ameisensäure durch *Bacterium coli commune*. Inaug. Diss., Heidelberg 1911.

Mittelwerte.

Nach	sind gebildet Ameisensäure
1 Tag	11,92 %
2 Tagen	11,73 %
3 „	10,16 %
4 „	12,25 %
5 „	8,72 %

Das Gärungsbild ist bei beiden Colistämmen annähernd dasselbe. In beiden Fällen zeigt sich am fünften Tage ein plötzliches Ansteigen der Vergärung. Sonst stimmen die Zahlen nur annähernd überein.

Die folgenden Versuche wurden alle bei 37° ausgeführt.

Die Versuche mit dem von Král bezogenen Colistamm wurden nach dreimonatlicher Pause wiederholt, um zu sehen, ob sich sein physiologischer Zustand durch wiederholtes Umimpfen wesentlich ändert.

Mittelwerte.

Nach	sind gebildet Ameisensäure
1 Tag	13,45 %
2 Tagen	12,45 %
3 „	11,62 %
4 „	12,57 %
5 „	11,59 %

Die Unterschiede gegenüber den früheren Werten sind nicht erheblich. Die Menge der gebildeten Ameisensäure ist etwas größer; ferner fehlt auch die plötzliche Zunahme der Vergärung während des fünften Tages. Es scheint also innerhalb der drei Monate eine geringe Änderung des physiologischen Zustandes eingetreten zu sein.

Der nächste Versuch wurde mit einem Colistamm aus dem Stuhl eines 31jährigen gesunden Mannes ausgeführt. Sein kulturelles, morphologisches und biologisches Verhalten war für *Bacterium coli* typisch, nur gab der eine Stamm eine sehr schwache Indolreaktion.

Mittelwerte.

Nach	sind gebildet Ameisensäure
1 Tag	14,88 %
2 Tagen	13,85 %
3 „	13,87 %
4 „	13,20 %
5 „	11,88 %

Mittelwerte.

Nach	sind gebildet Ameisensäure
1 Tag	18,03 %
2 Tagen	16,64 %
3 „	16,19 %
4 „	15,74 %
5 „	15,80 %

Die aus den beiden Kolonien entnommenen Stämme zeigen ein etwas abweichendes Verhalten. Die Bakterien des einen geben annähernd dasselbe Gärungsbild wie die früheren auch, nur sind die Zahlen etwas höher. Die der anderen bilden bedeutend mehr Ameisensäure; letztere gaben die schwache Indolreaktion.

Die Versuche wurden wegen des abweichenden Verhaltens der beiden Stämme mit Material gleicher Herkunft nach 3 Monaten wiederholt.

Mittelwerte.

Nach	sind gebildet Ameisensäure
1 Tag	15,30 %
2 Tagen	13,68 %
3 „	12,53 %
4 „	12,02 %
5 „	11,96 %

Die Versuchsreihen mit den Stämmen aus 2 verschiedenen Kolonien zeigten diesmal gute Übereinstimmung.

Weiter wurden Versuche mit einem *Bacterium coli* aus dem Stuhl eines vierjährigen Mädchens angesetzt. Der Stamm zeigte ein für *Bacterium coli* typisches Verhalten.

Mittelwerte.

Nach	sind gebildet Ameisensäure
1 Tag	15,67 %
2 Tagen	13,88 %
3 „	12,82 %
4 „	12,60 %
5 „	13,90 %

Dieser Stamm zeigt annähernd dasselbe Gärungsbild wie die früheren auch.

Dieser Stamm wurde in Form einer Strichkultur 6 Wochen bei 37° aufbewahrt und während dieser Zeit fünfmal umgeimpft,

um zu sehen, ob sich sein physiologischer Zustand dadurch wesentlich ändert; sein Aussehen war dasselbe geblieben.

Mittelwerte.

Nach	sind gebildet Ameisensäure
1 Tag	15,23 %
2 Tagen	15,01 %
3 „	14,15 %
4 „	12,98 %
5 „	11,84 %

Der physiologische Zustand hat sich etwas, aber nicht wesentlich geändert.

Weiter wurden Versuche mit einem Colistamm aus dem Stuhl eines 3¹/₂ jährigen Knabens angestellt. Auch dieser Stamm zeigte das typische Verhalten von *Bacterium coli*.

Mittelwerte.

Nach	sind gebildet Ameisensäure
1 Tag	15,84 %
2 Tagen	14,69 %
3 „	12,58 %
4 „	11,44 %
5 „	11,15 %

Weiter wurde versucht, aus dem Stuhl eines 36 Stunden alten Kindes *Bacterium coli* zu isolieren. Der Stuhl war schwarzbraun und zähe, also noch meconiumhaltig. Die Agarplatten gingen gut an; es war nur eine Art von Kolonien zu bemerken; auf der Oberfläche grauweiße saftige Flecken, die nur langsam wuchsen; im Innern der Platte kleine Punkte. Der eigentümliche Glanz der Colikolonien war nur bei einzelnen ganz schwach zu bemerken. Auf der Gelatineplatte zeigten sich am dritten Tage wenig charakteristische, grauweiße, runde Kolonien von verschiedener Größe, welchen der für *Bacterium coli* charakteristische gelappte Rand fehlte. Am vierten Tage trat bei allen Kolonien Verflüssigung ein, die sehr schnell um sich griff. Eine coliähnliche Kolonie war nicht zu finden. Trotzdem wurden auf der Agarplatte zwei, die mit denen des *Bacterium coli* noch die größte Ähnlichkeit zeigten, ausgewählt, Strichkulturen angelegt und Gärungsversuche angesetzt.

1. Ein mit Fuchsin gefärbtes Präparat zeigte kurze dicke Stäbchen mit abgerundeten Ecken, die zum Teil fast rund waren; sie waren entweder zu kurzen Ketten vereinigt oder lagen in Klumpen zusammen; längere Ketten waren nicht zu erkennen. Im hängenden Tropfen war keine Eigenbewegung zu beobachten.

2. Auf Kartoffeln entwickelte sich ein saftiger erbsengelber Belag, der von der Wachstumsform des *Bacterium coli* auf dem gleichen Material nicht zu unterscheiden war.

3. Milch war nach 3 Tagen geronnen.

4. Indol war nicht nachzuweisen.

5. In Traubenzuckeragar und -gelatine bildete sich auch bei achttägigem Stehen kein Gas; die Gelatine war längs des Striches verflüssigt.

6. Nitrit war nach 4 Stunden deutlich nachweisbar.

7. Tryptophan und Kreatinin konnten nicht aufgefunden werden.

8. Neutralrotagar, welcher nach Rotherberg¹⁾ von *Bacterium coli* in einen schmutziggrünen Farbstoff verwandelt wird, blieb unverändert.

Nach	sind vergoren Ameisensäure
1 Tag	1,06 ‰
2 Tagen	0,38 ‰
3 „	0,37 ‰
4 „	0,52 ‰
5 „	0,49 ‰

In dem *Bacterium* liegt also sicher kein *Bacterium coli* vor.

Auch aus dem Stuhl eines 6 Tage alten Brustkindes konnte kein *Bacterium coli* isoliert werden.

Auf der Agarplatte waren zwei verschiedene Arten von Kolonien zu bemerken. Einige zeichneten sich schon nach zwanzig Stunden durch ihre Größe aus; sie färbten sich bald orangerot. Die anderen Kolonien waren weiß, und im durchfallenden Lichte gelblich schimmernd. Auf Gelatine zeigten sich ganz ähnliche Wachstumserscheinungen; auch hier waren typische Colikolonien nicht zu erkennen; nach dem vierten Tage war vollständige

¹⁾ Zentralblatt f. Bakter., Bd. 24, S. 515, 1898; Bd. 25, S. 15, 1899.

Verflüssigung eingetreten. Es wurden wieder 2 Kolonien, die denen des *Bacterium coli* noch am meisten glichen, abgeimpft und untersucht.

Im gefärbten Präparat zeigten sich kleine, fast runde Bakterien, die meist in Haufen zusammenlagen, aber auch verschiedentlich kurze Ketten bildeten. Im hängenden Tropfen war keine Eigenbewegung zu erkennen. Wahrscheinlich lag eine der schon von Escherich beschriebenen Coccenarten, *Streptococcus coli gracilis* oder *Streptococcus coli brevis*, vor.

2. Auf Kartoffeln bildete sich nur ein dünner schwach gelber Überzug.

3. Milch gerann nur langsam nach 6—7 Tagen.

4. Indol, Kreatinin und Gasbildung in Traubenzuckeragar waren nicht festzustellen.

5. Nitrit war nach 4 Stunden deutlich nachweisbar.

Nach	sind vergoren Ameisensäure
1 Tag	0,30%
2 Tagen	0,10%
3 „	+ 0,13%
4 „	0,56%
5 „	+ 0,68%

Es lag also auch hier sicher kein *Bacterium coli* vor.

Als weiteres Untersuchungsmaterial diente ein Colistamm aus dem Stuhl eines 11 Wochen alten Kindes, welches mit Kuhmilch ernährt wurde. Dieser Stamm zeigte das typische Verhalten von *Bacillus coli commune*.

Mittelwerte.

Nach	sind gebildet Ameisensäure
1 Tag	18,43%
2 Tagen	17,48%
3 „	16,42%
4 „	16,75%
5 „	16,50%

Bei diesem Colistamm zeigt sich wieder das typische Gärungsbild, die Werte sind nur im allgemeinen etwas höher als die früheren. *Bacterium coli commune* scheint in den ersten Tagen nach der Geburt im Darm des Kindes nicht aufzutreten.

Als nächstes Untersuchungsobjekt diente ein Colistamm aus den Exkrementen einer Kuh. Der Stamm zeigte das typische Verhalten von *Bacterium coli commune*.

Mittelwerte.

Nach	sind gebildet Ameisensäure
1 Tag	14,41 %
2 Tagen	12,42 %
3 „	11,46 %
4 „	11,52 %
5 „	12,75 %

Die Werte sind annähernd dieselben wie bei den früheren Stämmen auch.

Weiter wurde ein Colistamm aus den Exkrementen eines Hundes untersucht. Auch dieser Stamm zeigte die typischen Reaktionen von *Bacterium coli commune*.

Mittelwerte.

Nach	sind gebildet Ameisensäure
1 Tag	14,35 %
2 Tagen	13,57 %
3 „	12,04 %
4 „	12,02 %
5 „	12,02 %

Auch hier ist das Gärungsbild dasselbe wie bei den meisten andern Colistämmen.

Vergleicht man die mit den verschiedenen Colistämmen erhaltenen Zahlen, so zeigt sich eine allgemeine Übereinstimmung des Gärungsbildes. Alle Stämme bilden innerhalb des ersten Tages kräftig Ameisensäure, dann tritt allmählich Vergärung ein. Genau übereinstimmende Werte werden nicht erhalten. Die verschiedenen Colistämme haben also je nach ihrer Herkunft eine verschiedene physiologische Wirksamkeit.

Von Interesse war es, festzustellen, wie sich das dem *Bacterium coli commune* so ähnliche *Bacterium typhi abdominalis* unter den gleichen Umständen verhält. Als Untersuchungsobjekt diente ein Stamm aus dem pathologischen Institut der Universität Heidelberg.

Nach	sind vergoren Ameisensäure
1 Tag	0,64 %
2 Tagen	0,63 %
3 „	0,52 %
4 „	0,75 %
5 „	0,60 %

Der Nährboden ist also für das Bacterium vollständig ungeeignet; Ameisensäure wird nur spurenweise angegriffen.

Um dem Bacterium typhi abdominalis bessere Bedingungen zu bieten, wurden Versuche mit ameisensäurehaltiger Nährboullion angesetzt und gleichzeitig Bacterium coli commune, und zwar der Stamm aus dem pathologischen Institut der Universität Heidelberg und der von Kräl unter denselben Bedingungen geprüft. Die Boullion war die in der Bakteriologie übliche Nährboullion, welche auf 100 ccm einen Zusatz von 0,4602 g Ameisensäure als Natriumsalz erhielt. Als Gärungsgefäße dienten die schon weiter oben erwähnten Kolben; jeder Kolben enthielt 100 ccm Nährlösung.

Stamm pathol. Institut. Mittelwerte.

Nach	sind vergoren Ameisensäure
1 Tag	20,09 %
2 Tagen	24,92 %
3 „	26,81 %
4 „	29,31 %
5 „	30,83 %

Stamm Kräl. Mittelwerte.

Nach	sind vergoren Ameisensäure
1 Tag	26,11 %
2 Tagen	31,24 %
3 „	35,18 %
4 „	39,51 %
5 „	43,46 %

Während Bacterium coli commune in der künstlichen Nährlösung am ersten Tage kräftig Ameisensäure bildet, setzt in Boullion sofort eine kräftige Vergärung ein, die in den folgenden Tagen weiter fortschreitet. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Colistämmen sind in Boullion viel größer als in der künstlichen Nährlösung.

Mittelwerte.

Nach	sind vergoren Ameisensäure
1 Tag	— 3,62 %
2 Tagen	0,85 %
3 „	6,83 %
4 „	14,19 %
5 „	14,80 %.

Im Gegensatz zu *Bacterium coli commune* bildet *Bacterium typhi abdominalis* innerhalb des ersten Tages Ameisensäure, später setzt dann eine kräftige Vergärung ein.
