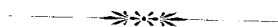




Ueber den Einfluss des Alkali
auf den Stoffwechsel der Mikroben.



INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER
MEDICINISCHEN DOCTORWÜRDE
VORGELEGT DER
HOHEN MEDICINISCHEN FACULTÄT
DER
ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT

ZU
FREIBURG IM BREISGAU

VON

Ferdinand Blumenthal

AUS

BERLIN.



FREIBURG im Breisgau
1895.

Gedruckt mit Genehmigung der medicinischen Facultät.

Der Decan:

Geh. Rat Professor Dr. Manz.

Der Referent:

Professor Dr. Schottelius.

Meinen geliebten Eltern gewidmet.



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

Ueber den Einfluss des Alkali auf den Stoffwechsel der Mikroben.

Von

Ferdinand Blumenthal.

Es ist bekannt, dass die Spaltpilze nur auf neutralem oder alkalischem Nährboden gedeihen. Da aber die meisten der gebräuchlichen Nährböden an und für sich sauer reagiren, so hat man stets ein gewisses Quantum Alkalilösung zugesetzt, bis die Reaction neutral oder schwach alkalisch war. In der Literatur ist diesem Punkt in Bezug auf die Bereitung der Nährböden nur soweit Aufmerksamkeit geschenkt worden, als Günther¹⁾ eine deutlich alkalische Reaction verlangt. C. Fränkel²⁾ spricht davon, dass bei saurer Reaction nur eine schwache Entwicklung stattfindet neben dem Auftreten von Hefepilzen als ungebetenen Gästen. Eine starke Alkalescenzen will Fränkel vermieden wissen, weil sie die durchsichtigen Nährböden trübe. In den älteren Fäulniss- und Gährungsversuchen wurde vielfach, namentlich von Hoppe-Seyler und seinen Schülern den Gährungsgemischen kohlensaurer Kalk hinzugesetzt, wohl in Analogie zu dem angewandten Verfahren zur Darstellung der Milchsäure, in der bestimmten Absicht, die bei der Gährung entstehenden Säuren zu binden, so dass die Flüssigkeit stets neutrale Reaction hatte, da es schon damals bekannt war, dass die Milchsäuregährung bei saurer Reaction bald still steht und nach Analogie mit dieser bei anderen mit Säurebildung verbundenen Gärungen dasselbe zu erwarten war. Grössere, ja selbst sehr bedeutende Mengen von kohlensaurem Natron haben bei den Fäulnissmischungen zuerst E. u. H. Salkowski³⁾ angewandt, nämlich

1) Einführung in das Studium der Bakterienkunde. 1893. S. 21, 113, 153.

2) Grundriss der Bakterienkunde. 1887. S. 96--99.

3) Zeitschrift für physiologische Chemie. VIII. S. 420. 1883.

auf je 1 Liter des dem Fleisch zugesetzten Wassers 25—30 cem kalt gesättigte Lösung von Natriumcarbonat. Die Autoren thaten dies, um sicher zu sein, dass die Fäulnismischung bis zum Ende der Fäulniss alkalische Reaction bewahrte. In neuerer Zeit haben namentlich Robert Koch und Hesse¹⁾ darauf hingewiesen, dass die Entwicklung der Cholera-spirillen sehr wesentlich davon abhängt, dass der Nährboden die richtige Menge Alkali enthält. Nur auf solchem Boden gezüchtete Cholera-vibrionen lassen sich nach Koch von ähnlichen Mikroben mit Sicherheit unterscheiden. Ebenso findet sich eine Notiz, durch welche der Verdacht ausgesprochen wird, dass das Alkali einen Einfluss auf die Bildung von Indol ausübe in der citirten Arbeit von E. u. H. Salkowski. Diese Forscher haben nämlich in einem Falle, wo sie nur halb so viel Na_2CO_3 -Lösung dem Zersetzungsmaterial zufügten, als bei den andern Versuchen eine grössere Indolmenge erhalten, als sonst. Dieses Resultat ist ihnen so auffallend, dass sie die erhaltene Zahl mit einem Fragezeichen versehen. Sie sagen darüber (l. c. S. 433.) „Sehr auffallend ist die aus der Reihe fallende Zahl für den Versuch VI. von nur 2tägiger Dauer; möglicherweise steht dieselbe mit der geringeren Alkalisierung in Zusammenhang, doch müssten hierüber noch besondere Versuche angestellt werden.“ Bei den Untersuchungen über Bernsteinsäure ergab sich für mich²⁾ die überraschende Thatsache, dass die Bildung derselben in hohem Maasse abhängig war, von dem Alkaligehalt der Mischungen. Wurden 250 g Pferdefleisch mit 1 Liter Wasser und $7\frac{1}{2}$ cem kalt gesättigte Sodalösung versetzt, so bildeten sich in 48 Stunden 1 g Bernsteinsäure; bei 30 cem Alkalizusatz nur noch 1 deg. Bei der gleichen Menge Rindfleisch wurden ohne Alkalizusatz 0,3 g; bei $7\frac{1}{2}$ cem Alkalilösung 0,46 g Bernsteinsäure gefunden. Ebenso wurde, wenn auch nicht quantitativ festgestellt, ein Einfluss des Alkalis auf die Bildung von Methylmercaptan und Schwefelwasserstoff³⁾ gefunden. Diese Thatsachen erschienen wichtig genug um die Frage von dem Einfluss des Alkalis auf den Stoffwechsel der Mikroben einer besonderen Untersuchung zu unterziehen, zumal derartige Untersuchungen geeignet schienen, darüber einige Aufklärung zu geben, warum vollvirulente Bakterien in dem einen Falle Krankheit hervorrufen, in dem andern nicht. Denn in Folge der Alkalescenzen des Blutes ist der Organismus ja auch nichts weiter als ein alkalischer Nährboden, dessen Alkalescenzen physiologisch und pathologisch Schwankungen unterliegt. Wäre es also der Fall, dass der Alkaligehalt des Nährbodens einen hervorragenden Einfluss auf die Bildung einzelner, namentlich schädlicher

1) Zeitschrift für Hygiene und Infectiouskrankheiten. Bd. XV. 2. S. 183. Siehe auch Dahmen, Centralblatt für Bakteriologie, Bd. 12, 1892, No. 18, S. 620, und Flügge, Zeitschrift für Hygiene, Bd. 14, 1893, S. 195.

2) Virchow's Archiv. Bd. 137. II. 3. S. 539—568.

3) Ebendas. S. 565.

Stoffwechselproducte hat, so war die Erklärung für die verschiedene Einwirkung der Mikroben auf den infectirten Organismus bis zu einem gewissen Grade wenigstens gegeben.

Sollte nun der Einfluss des Alkalis einer Untersuchung unterzogen werden, so war es selbstverständlich, dass es für den Zusatz von Alkali eine bestimmte Grenze geben konnte, bei der eine Zersetzung nicht mehr oder nur noch in abgeschwächtem Maasse stattfinden konnte. A priori war es auch nicht möglich zu wissen, ob durch Variation des Alkalizusatzes nicht überhaupt die Intensität der Zersetzung beeinflusst wurde und ob nicht die erheblichen Unterschiede in den früher erhaltenen Resultaten auf eine Förderung oder Hemmung der Gesamtzersetzung zurückzuführen seien. Doch war dieses wenigstens in dem einen erwähnten Versuch von E. u. H. Salkowski nicht der Fall, da hier procentisch dieselbe Quantität Eiweiss ungelöst geblieben war, wie in den andern Versuchen.

Gang der Untersuchung.

Eine grosse Schwierigkeit stellte sich der Beantwortung der vorliegenden Frage schon dadurch entgegen, dass der Stoffwechsel der Reinculturen nur wenig methodisch untersucht ist. Man hatte sich vielfach damit begnügt, was ja von hoher Wichtigkeit ist, festzustellen, wie das mit einer bestimmten Mikrobenart geimpfte Nährmaterial an sich oder in seinen Auszügen mit Alkohol, Glycerin etc. auf den tierischen Organismus wirkte. Hier aber handelte es sich darum festzustellen, ob die Stoffwechselproducte im einzelnen vom Alkali beeinflusst würden in Bezug auf die gebildete Quantität. Es konnten also bei der Untersuchung nur solche Producte in Frage kommen, deren Nachweis quantitativ möglich war. Da aber die Reinculturen nur eine geringe Ausbeute liefern und die Genauigkeit der Methoden mit der geringeren Ausbeute abnimmt, so mussten erstens die Versuche mit Reinculturen über Wochen ausgedehnt werden, damit die Ausbeute eine brauchbare war, zweitens war zu befürchten, dass die Präcision der Resultate durch die Mangelhaftigkeit der Methoden leiden würde. Schliesslich waren aber Untersuchungen mit Reinculturen unerlässlich, da nur durch diese zu erkennen war, ob das Alkali innerhalb des Stoffwechsels einer einzigen Art bedeutende Abweichungen in der Zersetzung verursacht. Andererseits war es aber auch nicht unwichtig und uninteressant diese Frage an Mischculturen zu beantworten, zumal die Infectionen beim Menschen meist Mischinfectionen sind. Dazu kam noch, dass die Zersetzungen mit Mischculturen nur über kurze Zeit ausgedehnt zu werden brauchten und auch eine grössere Ausbeute als bei Reinculturen erwarten liessen. Als Repräsentant von Mischculturen wurde jenes Gemisch von Mikroorganismen untersucht, das man als Fäulnisserreger zu bezeichnen pflegt. Die Kenntniss der Fäulniss ist

gerade darum, wie E. Salkowski ausführt, von hohem Interesse, weil sie der Darmfäulniss am ähnlichsten ist. Diese Darmfäulniss ist aber, wie bekannt, häufig die Ursache infectiöser und toxischer Erkrankungen.

Da die Fäulnissrerger stets auf gleiche Art gewonnen, d. h. aus gleichem Material und bei gleichem Alkaligehalt und nach gleicher Zeitdauer zum Ueberimpfen benutzt wurden, so liegt darin wohl eine genügende Garantie für die Gleichartigkeit der Fäulnissrerger und für die Vergleichbarkeit der Versuche.

Fäulniss.

Bei diesen Untersuchungen war es unmöglich sämtliche Spaltungsproducte zu berücksichtigen, welche durch die Fäulnissrerger aus eiweisshaltigem Material gebildet werden konnten. Abgesehen davon, dass nur ein Theil derselben gut bekannt ist, sind selbst unter den gut bekannten Körpern nur für eine verhältnissmässig geringe Zahl Methoden zur quantitativen Bestimmung vorhanden. Eine annähernd quantitative Bestimmung der Producte ist aber zur Beurtheilung der vorliegenden Frage Vorbedingung. Ausserdem ist die geringe Ausbeute der einzelnen Körper, welche bei der Fäulniss, noch mehr bei den Versuchen mit Reinculturen zu erwarten stand, ein Punkt gewesen, der immer wieder die Beurteilung der Frage erschwerte. Beide Punkte, sowohl die nur annähernde Genauigkeit der Methoden in quantitativer Beziehung, als auch die geringe Ausbeute der einzelnen Producte zwangen, nur den grösseren Unterschieden in der Ausbeute ein Gewicht beizulegen, kleinere, vielleicht mit Unrecht, vorläufig noch zu vernachlässigen.

Da es nun bei der vorliegenden Frage vorerst überhaupt nur darauf ankommt, festzustellen, ob ein Einfluss des Alkali auf den Stoffwechsel der Mikroben vorhanden ist, so genügte es vorläufig, die Untersuchungen bei der Fäulniss auf die folgenden Producte zu beschränken, deren Untersuchung an und für sich ein grösseres Interesse beansprucht. Diese Produkte sind Schwefelwasserstoff, Methylmercaptan, Anmoniak, Indol, Phenol, die flüchtigen und die nicht flüchtigen Säuren. Zugleich war in der Bestimmung der nicht gelösten Eiweisskörper ein Maassstab für die Intensität der Zersetzung unter dem Einfluss des Alkali gegeben. Ehe ich zur endgültigen Schilderung der schliesslich angewandten Untersuchungsmethode komme, glaube ich noch einiges darüber mittheilen zu müssen, was mich veranlasst hat, am Ende so zu verfahren, wie es geschehen ist.

Methylmercaptan.

Dieser Körper ist zuerst von Nencki¹⁾ als Spaltungsproduct des Eiweiss durch *Bact. liquefaciens magnum* gefunden worden. Indessen ist

1) Monatshefte für Chemie. Bd. X. 1889. S. 526.

zu bemerken, dass schon frühere Angaben vorliegen, welche auf die Entstehung des Mercaptans bei der Fäulniss hinweisen. E. u. H. Salkowski sagen bereits in ihren ersten Mittheilungen¹⁾ über Eiweissfäulniss bezüglich des Destillates aus gefautem Fleisch „die noch vor dem Kochen übergehenden Wasserdämpfe führten höchst geringe Mengen eines schwach gelblichen in Wasser untersinkenden Oeles von entschieden mercaptanartigem Geruch mit sich. Durch die reichliche Bildung von Schwefelnatrium beim Erhitzen mit Natrium erwies sich dasselbe als stark schwefelhaltig. Die Prüfung auf Stickstoff ergab ein negatives Resultat. Zur genaueren Untersuchung reichte seine Menge nicht aus. Es ist hiermit zum ersten Mal eine organische Schwefelverbindung als Spaltungsproduct des Eiweiss erhalten worden.“ Ebenso äussern sich dieselben dahin, dass an dem Fäulnissgeruch die mercaptanartigen äusserst flüchtigen Substanzen theilhaftig seien.²⁾

Später gelang es besonders Rubner³⁾ aus Eiweiss und den verschiedensten eiweisshaltigen Körpern, bei der Kalischmelze des Eiweiss sowohl, wie bei der bakteriellen Einwirkung, ja selbst beim Kochen mit Wasser Mercaptan abzuspalten und den Nachweis zu führen, dass es sich fast ausschliesslich um Methylmercaptan dabei handelt. Damit war die physiologische und pathologische Bedeutung dieses Körpers dargethan, zumal Rekowski⁴⁾ die starke Giftigkeit dieser Verbindung gezeigt hatte. Er hatte nämlich gefunden, dass 0,033 g Methylmercaptan pro Kilo Thier schwere Intoxicationserscheinungen hervorriefen und dass bei 0,13 g pro Kilo Thier der Tod eintrat. Zum Nachweis des Mercaptans folgte ich der Methode von Nencki, welcher das Mercaptan in 3 pCt. Cyanquecksilberlösung leitete. Es schlägt sich dabei Quecksilbermercaptid nieder. Zum weiteren Nachweis zersetzen Nencki und Rubner das Quecksilbermercaptid durch 3 proc. Salzsäure und leiten das entstehende Gas in 3 proc. Bleizuckerlösung, in welcher sich alsdann gelbes Bleimercaptid ausscheidet. Diese Methode ist besonders dann nothwendig, wenn, wie es sehr häufig geschieht, beim Durchleiten der Fäulnissgase durch Quecksilbercyanidlösung nicht allein Quecksilbermercaptid, sondern auch Schwefelquecksilber sich bildet, welches als schwarzer Niederschlag das Quecksilbermercaptid verdeckt. Bei diesem Verfahren ist es aber schwer den Endpunkt der Gasabstreitung festzustellen, wenigstens konnte ich mich überzeugen, dass bei der Oeffnung des die Quecksilberverbindungen enthaltenden Kolbens, lange, nachdem in der Bleilösung keine Gasblasen mehr aufgetreten waren, noch ein starker Geruch nach faulem Kohl entströmte, was darauf schliessen liess, dass noch nicht alles Mercaptan ausgetrieben

1) Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft. XII. S. 651. 1879.

2) Zeitschrift für physiol. Chemie. VIII. S. 449. 1885.

3) Hygienische Rundschau. 1893. Archiv für Hygiene. Bd. XIX. 1893.

4) Annales de l'inst. impér. 1893. S. 205.

war. Ausserdem fand ich, wie auch schon Rubner beobachtet hatte, dass nur in den ersten Minuten nach der Erhitzung des die Quecksilberverbindungen enthaltenden Kolbens in der Bleilösung ein gelb-röthlicher Niederschlag ausfiel, dagegen später ein schmutzig brauner krystallinischer, der wohl kaum ohne weitere Analyse als Bleimercaptid in Betracht gezogen werden konnte. Eine dritte Schwierigkeit besteht darin, dass an und für sich das Verfahren nicht ganz genau ist, und dass die Ungenauigkeit wächst mit der geringeren Ausbeute. Deshalb hat sich Rubner bei seinen Versuchen eine Skala construirt, nach der er die erhaltenen Resultate corrigirte. Ich habe mich der Ueberführung des Quecksilbermercaptids in Bleimercaptid bei den Rindfleischversuchen bedient. Erst als sich bei diesen die eben erwähnten Unbequemlichkeiten herausstellten, versuchte ich beim Fibrin die Beobachtung zu benutzen, dass Methylmercaptan und Schwefelwasserstoff nicht zugleich in die Cyanquecksilberlösungen übergingen, sondern sich bei einigem Auffassen durch fraktionirtes Auffangen gut trennen liessen.

Indol.

Bei den Versuchen mit Rindfleisch, welche nur eine geringe Ausbeute erwarten liessen, wurde versucht das Indol colorimetrisch zu bestimmen. Als geeignet erschien dazu die Nitrosoindol — sog. Cholerarothreaction. Zu diesem Zweck wurden je 5 ccm von dem das Indol enthaltende Destillat des Rindfleischversuchs I mit 1 ccm 0,02 proc. Kaliumnitritlösung und mit 1 ccm conc. H_2SO_4 versetzt. Alle Proben stimmten an Intensität und Charakter der Färbung überein. Es war eine prachtvoll himbeerrothe Färbung entstanden. Ebenfalls stimmten die Proben des Destillats des Rindfleischversuchs II genau ebenso behandelt, unter sich überein. Aber die rothe Farbe war mehr kirschroth und trübe. Eine Vergleichung der Proben des Destillats I und II in Bezug auf ihre Intensität war unmöglich. Auch durch Verdünnung wurde nichts erreicht, ebensowenig durch Ausschütteln der Farbstoffe mit Amylalkohol, in welchen sie übergingen. Die Farben waren eben andere und darum zur colorimetrischen Vergleichung nicht geeignet.

Hier möchte ich noch einige Bemerkungen über Beobachtungen anknüpfen, die ich über die Rothfärbung der indolhaltigen Lösungen gemacht habe. Bei den Proben des Destillats II. wurde ein allmähiges Ausfallen eines bläulichen Farbstoffs in 2 bis 7 Tagen beobachtet. Dies ging einher mit Erblassen der darüber stehenden Flüssigkeit. Der Farbstoff wurde abfiltrirt, dann mit 90 pCt. Alkohol übergossen, in dem er sich mit schön violetter Farbe löste. Diese Farbe ging aus der alkoholischen Lösung weder in Aether, noch in Chloroform über. Sie verblasste aber bald ein wenig, indem sie braunroth wurde mit einer violetten Opalescenz. So erhielt sie sich unverändert von November 1894 bis jetzt (April 1895).

Genau die Eigenschaften dieses Farbstoffs hatte ein zweiter, gleichfalls aus Destillat II gewonnener. Dieser war folgendermassen erhalten worden. Der wässrige

Rückstand des zur Entfernung des Indol und Phenol mit Aether behandelten Destillates wurde mit Natronlauge alkalisirt und dann mit Salzsäure wieder angesäuert.¹⁾ Es trat sofort eine schwache Rosafärbung auf, welche allmählig nach Wochen purpurroth wurde. Dieses Purpurroth wurde allmählig mehr violett und liess schliesslich mit den Staubpartikeln einen blauen Farbstoff ausfallen, der die oben erwähnten Eigenschaften besass. Ein Erblässen der Flüssigkeit hatte nicht stattgefunden. Ich versetzte nun alle derartigen Destillate mit NaOH und HCl, bemerkte auch stets eine Rosafärbung, doch nie von der zuerst beobachteten Intensität, vielleicht, weil ich sie mit Papier bedeckte, um sie vor Staub zu schützen, dem Staub aber, wie ich glaube und weiter unten erörtern werde, ein wesentlicher Antheil an der Rothfärbung zuzuschreiben ist. Jedesmal versetzte ich nun auch Proben der indolhaltigen Flüssigkeiten mit NaOH und HCl und erhielt jedesmal eine Rothfärbung. Die Reaction verblasste jedoch nach einigen Minuten.

Es handelt sich hier also um zweierlei:

1. um Rothfärbung der indolhaltigen Flüssigkeiten mit NaOH und HCl;
2. um die Rothfärbung der durch Aether vom Indol befreiten Destillate mit NaOH und HCl.

Im ersten Falle enthielt vielleicht die benutzte Natronlauge Spuren von Kaliumnitrit. Bei der Prüfung mit Phenylendiamin und Schwefelsäure erwies sie sich allerdings als nitritfrei. Aber möglicherweise ist diese Farbstoffbildung ein feineres Reagens auf Kaliumnitrit, als das Phenylendiamin.

Für diese letzte Hypothese sprechen einige zu diesem Zwecke an einem durch Pankreasfäulniss gewonnenen indolhaltigen Destillate angestellte Proben.

Je 5 cem Destillat + 2 cem NaOH + 2 cem HCl²⁾ gaben sofort intensive Rosafärbung, nach $\frac{1}{2}$ Stunde verblasste die Reaction völlig. Füge ich dann zu einigen Proben 1 Tropfen 0,02 proc. Kaliumnitritlösung, so fingen dieselben sofort an, sich röthlich zu färben, was mit jedem Tage intensiver wurde, trotzdem aber nicht die Intensität der ersten Reaction erreichte. Die nicht mit Kaliumnitrit versetzten Proben waren nach 14 Tagen noch entfärbt. Setzt man sofort d. h. vor dem Verblässen einen Tropfen Kaliumnitrit zu, so hält sich die Rothfärbung unbegrenzt.

Setzt man $\frac{1}{2}$ cem 2 pCt. Kaliumnitrit zu 5 cem Destillat, fügt dann je 2 cem NaOH und HCl hinzu so tritt keine Reaction ein, genau wie bei der Cholerarothreaction. Die Probe wird gelb. Ist die letzte Hypothese richtig, d. h. handelt es sich um Spuren von Nitrit, die durch den Zusatz von NaOH und HCl in einer indolhaltigen Flüssigkeit eine Rothfärbung herbeiführen, so würde das allmähliche Rothwerden der allerdings vom Indol befreiten Destillate³⁾ auf allmähliche Nitrirung der Flüssigkeiten durch salpetrige Säure zurückzuführen sein, die ja in der Luft, namentlich der Laboratorien, beziehungsweise im Staub in Spuren vorhanden ist.

Ad 2 ist auch die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, dass diese Reaction nicht sowohl dem Indol, als vielmehr einem indolartigen Körper zukommt. Damit würde die Rothfärbung an den mit Aether ausgeschüttelten Destillaten im Einklang stehen. Dieser indolartige Körper könnte dann allerdings nicht, wie das Indol in den Aether übergehen. Dass diese Reaction beim Sieden an der Luft deutlicher wird, also dass eine allmähliche Nitrirung die Reaction begünstigt, braucht dieser Annahme nicht zu widersprechen. Aehnliche Beobachtungen, welche auf einen indolartigen, wenig in

1) Zu diesen Versuchen gelangte ich durch die Beobachtung, dass beim Destillat II. die Natronlauge, welche das Phenol enthielt, beim Ansäuern mit HCl sich roth färbte. Ebenfalls beobachtete ich dies bei Fibrin C.

2) Dies schien mir das günstigste Mengenverhältniss zu sein.

3) Es müsste hierbei vorausgesetzt werden, dass Spuren von Indol zurückblieben.

Aether löslichen Körper hinweisen, liegen schon vor von verschiedenen Autoren.¹⁾ Interessant ist übrigens noch, dass bei den Destillaten, welche vom Indol befreit waren, selbst dann, wenn sie mit NaOH und HCl noch eine schwache Rosafärbung gaben, die Cholerareaction auch nach der E. Salkowski'schen Vorschrift²⁾ negativ war. Dies könnte sowohl mit der Ansicht, dass die Reaction mit NaOH und HCl eine Reaction zur Erkennung von Spuren von Nitrit in indolhaltigen Lösungen, als auch mit jener, dass das beschriebene Verhalten der durch Ausschütteln mit Aether von Indol befreiten Flüssigkeit auf der Gegenwart eines neuen indolartigen Körpers beruht, in Einklang gebracht werden. Ich möchte mich nach den hierbei gemachten Erfahrungen für die erste Ansicht aussprechen, glaube aber, dass man die zweite noch nicht ganz von der Hand weisen kann. Was die Cholerarothreaction selbst anbetrifft, so ist es unbedingt nöthig, sich dabei an die Vorschrift von E. Salkowski zu halten, da ich bei Verletzung dieser Vorschrift oft eine negative Reaction erhalten habe, fast immer eine weniger deutliche, als bei Innehaltung derselben. Statt conc. Schwefelsäure konnte ich mich, so oft ich darauf prüfte, mit gleichem Erfolge der gewöhnlichen etwa 25 proc. Salzsäure bedienen.

Kehren wir zur quantitativen Bestimmung kleiner Mengen Indol bei der Fäulniss zurück. Nachdem die Unbrauchbarkeit der Cholerarothreaction zur colorimetr. quantitat. Bestimmung dargethan war, wurde versucht das Indol als pikrinsaures Indol nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurde der Aetherrückstand in Ligroin gelöst und mit einer Lösung von Pikrinsäure in Benzol versetzt. Das pikrinsäure Indol wurde nach 24 Stunden abfiltrirt und über Schwefelsäure getrocknet. Das so erhaltene pikrinsäure Indol enthielt aber noch freie Pikrinsäure. Diese wurde durch Uebergiessen einer bestimmten Menge heissen Wassers (100 ccm) auf das Filter entfernt. Dabei geht aber, wie ich mich überzeugte, auch etwas pikrinsaures Indol in Lösung. Diese Methode kam bei den Rindfleischversuchen und dem Fibrinversuch C in Anwendung. Um die Resultate dieser Methode mit dem weiter unten angegebenen Verfahren der direkten Ausschüttelung des Indols mit Aether und Wägung des beim Abdestilliren des Aetherausuges bleibenden Rückstands zu prüfen, wurde ein Theil des Destillates der Fibrinversuche A. und B. nach der direkten Methode, ein Theil nach der Methode mit Pikrinsäure verarbeitet. Es ergab sich demnach

I. Gesamt-Indol aus pikrinsaur. Indol berechnet.	II. Gesamt-Indol direct bestimmt.	Verhältniss von I:II in Procenten ausgedrückt.
A. 0,365 g	0,472 g	77,4 pCt.
B. 0,215 g	0,418 g	51,5 pCt.

Genaue Resultate liefert nur die directe Methode. Danach schüttelt man das Destillat nach Ansäuerung desselben mit HCl mit Aether und dann den Aether, um das Phenol zu entfernen, mit verd. NaOH. Der

1) Vergl. E. und H. Salkowski, Zeitschrift für physiol. Chemie. Bd. VIII. S. 425.

2) E. Salkowski, Practicum. S. 299.

Aether wird abgehoben und bis auf wenige Ccm. abdestillirt. Der Aetherrückstand wird vorsichtig unter Nachspülen mit Aether in ein gewogenes möglichst kleines Becherglas gebracht und der Aether auf einem vorher erwärmten Wasserbad verdunstet. Das Indol scheidet sich krystallinisch aus.¹⁾ Dies Verfahren ist, wie ich mich überzeugte, auch dort, wo es sich nur um den Nachweis geringer Mengen Indol handelt, gut anwendbar. Es sei hier noch bemerkt, dass nur das aus der Fäulniss des Eiweiss isolirte Indol einen unerträglichen Gestank verbreitete, während das Indol, welches durch *Bact. coli* abgespalten wurde, einen reinen intensiven Jasmingeruch erkennen liess, der in keiner Weise etwas unangenehmes hatte.

Flüchtige und nicht flüchtige Säuren.

Dieselben wurden durch Titration mit Halbnormallauge und Rosolsäure bestimmt. Es war nicht möglich die Gesamtmenge zu titiren, da die Ausbeute eine sehr grosse war. Es wurde in der beim Gesamtverfahren angegebenen Weise das Destillat, das die flüchtigen Säuren enthielt, getheilt. Weit grössere Schwierigkeiten verursachte die Titration der nicht flüchtigen Säuren. Den Aetherrückstand in Wasser zu lösen ist nicht möglich, da man eine trübe, undurchsichtige Lösung erhält und sich nicht der ganze Rückstand in Wasser löst. Er wurde deshalb in Alkohol gelöst und von der alkoholischen Lösung ein Theil titirt, was mit genügender Genauigkeit gelingt. Allerdings muss der Zusatz von Rosolsäure ziemlich reichlich bemessen werden. Beabsichtigt man neben der Bestimmung der Gesamtsäuremenge auch die Trennung der einzelnen nicht flüchtigen Säuren vorzunehmen, so kann man nicht Alkohol zur Lösung des Aetherrückstandes gebrauchen, da die nicht flüchtigen Säuren durch denselben zum Theil aetherisirt werden. Ich habe in diesen Fällen bei den Versuchen mit *Bact. coli* den Aetherrückstand wieder mit Aether gelöst, auf 250 ccm gebracht und 50 ccm zur Titrirung abgenommen. Diese wurden mit 200 ccm Wasser ordentlich durchgerührt in einem Erlenmeyerschen Kolben und dann unter fortwährendem Durchschütteln mit Laemus und Halbnormallauge titirt.

Methode der quantitativen Bestimmung von Methylmercaptan, Schwefelwasserstoff, Ammoniak, Indol, Phenol, flüchtigen und nicht flüchtigen Säuren, unzersetztem Eiweiss in den Fäulnissmischungen.

Das Verfahren, welches auf Anrathen von Herrn Prof. Salkowski und auf Grund der oben mitgetheilten Untersuchungen benutzt wurde, und welches sich im wesentlichen auf die Vorarbeiten von Nencki,

1) Siehe auch Zeitschrift für physiol. Chemie. Bd. VIII. S. 420 etc.

Salkowski, Baumann, Brieger, Rubner u. A. stützte, war folgendes.

Der Kolben, welcher das Zersetzungsmaterial enthielt, wurde mit einem doppelt durchbohrten Pfropfen versehen, welcher luftdicht schloss. Durch die eine Durchbohrung tauchte ein Glasrohr in die Flüssigkeit ein. Dieses war dazu bestimmt Luft in den Kolben anzusaugen; ein zweites Glasrohr, welches durch die zweite Durchbohrung ging und nicht in die Flüssigkeit eintauchte, stand durch Gummischlauch und Glasrohr mit einer 3 proc. Cyanquecksilberlösung in Verbindung, in welche während und nach der Zersetzung die entweichenden Gase Schwefelwasserstoff und Methylmercaptan eingeleitet wurden. So wurde der Kolben, nachdem alle Poren des Korkens mit Paraffin luftdicht verschlossen waren, mit der Vorlage bei 39—41° constanter Temperatur stehen gelassen. Zur Untersuchung auf die oben genannten Producte wurde der Kolben auf ein Wasserbad gesetzt, während die Cyanquecksilberlösung gleichfalls mit einem doppelt durchbohrten festschliessenden Pfropfen versehen wurde. Durch die eine Durchbohrung tauchte das Glasrohr, das mit dem Kolben in Verbindung stand, in die Cyanquecksilberlösung ein. Ein zweites kurzes nicht eintauchendes Glasrohr stand durch einen Gummischlauch mit einer Wasserstrahlpumpe in Verbindung, welche an der Wasserleitung angebracht war. Letztere wurde nun geöffnet und das Wasserbad erhitzt. Während nun Luft in den Kolben angesogen wurde, gingen Mercaptan und Schwefelwasserstoff in die Cyanquecksilberlösung über, in welcher sich eine grünliche Haut resp. ein grünlicher oder schwärzlicher Niederschlag bildete. Nach Austreibung der Gase, was nach 2 Stunden etwa beendet war, wurden die Niederschläge auf gewogene Filter gebracht über H_2SO_4 getrocknet und gewogen. War Quecksilbermercaptid und Quecksilbersulfid zugleich vorhanden, so wurde der Niederschlag vom Filter abgespritzt, die Flüssigkeit in einem markirten Kolben bis zur Marke (260 ccm) aufgefüllt und mit 40 ccm gewöhnlicher etwa 25 proc. Salzsäure versetzt, so dass die Flüssigkeit etwa 3 pCt. Salzsäure enthielt. Der Kolben wurde erhitzt und die Gase in eine 3 proc. Bleizuckerlösung übergeführt. Bei den Versuchen mit Fibrin wurde beim Austreiben der Gase durch fraktionirtes Auffangen der Gase eine genügende Trennung herbeigeführt. Bei diesem Verfahren musste beim Wechsel der Cyanquecksilberlösung die Austreibung der Gase unterbrochen werden. Man braucht dazu nur den Hahn der Wasserleitung zu schliessen; dann hört sofort jede Gasentwicklung auf.

Nach Entfernung der Gase wurden von der Fäulnissmischung ohne Aenderung der Reaction 600 ccm abdestillirt, dann nochmal der Rückstand mit 600 ccm Wasser versetzt und wieder bis zu einem bestimmten Volumen = 1300 ccm abdestillirt. In dem Destillat fand sich Phenol und Indol. Zur Bestimmung des Phenols wurden 300 ccm vom Destillat

abgenommen, mit Salzsäure angesäuert und mit Bromwasser gefällt. Nach 24 Stunden wurde der Niederschlag durch ein gewogenes Filter abfiltrirt, das Filtrat stehen gelassen, um zu sehen, ob noch etwas später ausfiel, der Niederschlag über Schwefelsäure getrocknet und gewogen und aus dem erhaltenen Tribromphenol das Phenol berechnet.

Der Rest des Destillats wurde zur Bestimmung des Indols verwandt, welches entweder als pikrinsaures Indol oder reines Indol dargestellt wurde. Das Destillat wurde dazu mit Aether ausgeschüttelt; der Aetherauszug mit kleineren Volumen stark verdünnter Natronlauge mehreremale durchgeschüttelt. Die aetherhaltige Flüssigkeit wurde abgehoben, der Aether grösstentheils abdestillirt, der Rest in einem gewogenen kleinen Becherglase verdampft, dieses über H_2SO_4 getrocknet und als Indol gewogen.

Das vom Indol und Phenol befreite wässrige Destillat wurde auf ein bestimmtes Volumen = 1500 ccm gebracht und 50 ccm davon zur Ammoniakbestimmung genommen. Zu diesem Zweck wurde der N-Gehalt darin bestimmt und daraus das vorhandene Ammoniak berechnet.

Die wässrige nach der ersten Destillation (Indol und Phenol) gebliebene rückständige Masse wurde in eine Porzellanschale gebracht, zur Syrupdicke eingedampft und der Rückstand mit 90 pCt. Alkohol dreimal ausgezogen und die Auszüge filtrirt. Der Filtrerrückstand wurde zur Bestimmung der unzersetzten Eiweissmenge verwandt. Die alkoholischen Auszüge wurden auf dem Wasserbad verdunstet; der Rückstand in Wasser gelöst, auf ein bestimmtes Volumen = 500 ccm gebracht und davon die Hälfte mit 50 ccm verdünnter (1:5) Schwefelsäure angesäuert und destillirt, bis 150 ccm im Destillat waren. Dann wurde der Rückstand nochmal mit 100 ccm Wasser versetzt und wieder 100 ccm abdestillirt, so dass das Destillat etwa 250 ccm betrug. Dies wurde genau auf 300 ccm gebracht, davon 50 ccm abgenommen und zur Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren mit Halbnormallauge unter Zusatz von einigen Tropfen Rosolsäure titirt. Der nach der Destillation gebliebene Rückstand wurde dreimal mit der gleichen Portion Aether und Alkohol (10:1) ausgeschüttelt, der Aether abgehoben und abdestillirt. Der Aetherrückstand wurde mit 90 pCt. Alkohol gelöst, auf 500 ccm gebracht, 50 ccm abgenommen und gleichfalls mit Halbnormallauge unter Zusatz von Rosolsäure titirt.

Um die unzersetzte Eiweissmenge zu bestimmen, wurde der nach Filtration der Alkoholauszüge gebliebene Rückstand vorsichtig vom Filter abgenommen, in ein Stöpselglas gebracht, mit abs. Alkohol versetzt und 8 Tage stehen gelassen. Nun wurde der Alkohol abfiltrirt und der Rückstand mit Aether versetzt und 8 Tage in demselben Gefäss verwahrt. Dann wurde der Aether durch Filtriren entfernt und der Rückstand über Schwefelsäure getrocknet und gewogen; in dem Rückstand wurde nach

Kjeldahl der Stickstoff bestimmt und daraus die Quantität des unzersetzten Eiweiss berechnet.

Die Untersuchungen wurden nun so angestellt, dass in allen Versuchen gleich war: Das Verhältniss des Eiweiss zum Wasser, die Temperatur, der Luftzutritt, die Natur der Fäulniserreger,¹⁾ das fäulnissfähige Material; verschieden nur die Alkaleszenz der Mischungen.

A. Versuche mit Rindfleisch.

I. 245 g möglichst fettfreies, fein gehacktes Rindfleisch wurde mit 1 Liter Wasser versetzt und das Ganze ordentlich verrührt. Hierzu wurden 7 cem 10proc. Na_2CO_3 -Lösung hinzugefügt. Dies wurde mit einigen Tropfen Fäulnissmischung und einer fauligen Fleischflocke beschickt und bei einer Temperatur von 39–41° 7 Tage stehen gelassen. Der Kolben, welcher die Fäulnissflüssigkeit enthielt, war mit 15 cem einer 3proc. Cyanquecksilberlösung in Verbindung gebracht. — II. 245 g genau so behandelt, jedoch mit 30 cem 10proc. Na_2CO_3 -Lösung versetzt.

Ich lasse die Schilderung der Versuche I. und II. neben einander folgen, weil so der etwaige Einfluss des Alkali auf die einzelnen Producte am deutlichsten hervortritt.

Nach 20 Stunden ist die Fäulniss in I. und II. sehr stark, doch hat in II. eine Quellung der Substanz stattgefunden, welche zugleich eine glasige Beschaffenheit angenommen hat.

I. Die Cyanquecksilberlösung ist schwach gelbgrün gefärbt, beim Schütteln des Zersetzungskolbens steigen reichlich Gasblasen in ihr auf, an deren Eintrittsstelle sich grüne Häutchen bilden. — II. Die Cyanquecksilberlösung erscheint unverändert.

Nach 48 Stunden: I. Das feste Material zeigt flockige, hellgelbe Beschaffenheit, die Flüssigkeit eine braunrothe Farbe. In der Cyanquecksilberlösung reichlich dunkelgrüner Niederschlag. — II. Das feste Material zeigt flockige, glasige Beschaffenheit von schmutzig grüner Farbe. Die Flüssigkeit ist dunkelbraun. In der Cyanquecksilberlösung kein Niederschlag, doch Trübung und Geruch nach faulem Kohl.

Nach 72 Stunden: I. Theils schwarzer, theils dunkelgrüner reichlicher Niederschlag in der Cyanquecksilberlösung. — II. Geringer dunkelgrüner Niederschlag in der Cyanquecksilberlösung.

Nach 120 Stunden: Das Aussehen der Cyanquecksilberlösung I. und II. ist annähernd das Gleiche. Schwarzgrüner Niederschlag in einer grünlich gefärbten Flüssigkeit. Ein Unterschied in der Menge des Niederschlages ist schwer zu finden.

Resultate.

Es wurde gefunden: I. Gesamt-Quecksilberniederschlag 0,956 g; II. An Quecksilber gebundener Niederschlag 0,889 g. Die Trennung von Mercapian und Schwefelstoff missglückte.

I. Tribromphenol 0,9127 g, daraus Phenol 0,259 g. — II. Tribromphenol 0,896 g, daraus Phenol 0,254 g.

I. Picrinsaures Indol 0,367 g, daraus Indol 0,139 g. — II. Picrinsaures Indol 0,139 g, daraus Indol 0,052.

1) Ueber die Gewinnung der Fäulniserreger, s. Salkowski, Practicum. S. 291.

Flüchtige Säuren gesättigt durch: I. 272,0 cem, — II. 306,5 cem Halbnormallauge.

Nicht flüchtige Säuren gesättigt durch Halbnormallauge: I. 96,5 cem. — II. 118,0 cem.

Ammoniak: I. 1,895 g. — II. 1,962 g.

Unzersetzter Rückstand: I. 14,68 g, davon Eiweiss 12,384. — II. 16,01 g, davon Eiweiss 12,468 g.

Diese beiden Versuche lassen einen Einfluss des Alkali erkennen auf die Bildung von Indol, flüchtigen und nicht flüchtigen Säuren.

Kein Einfluss war zu erkennen auf Phenol- und Ammoniakbildung, ebenso auf die Intensität der Zersetzung durch die Mikroben.

Obwohl die Indolbestimmung in Folge der hier zur Verwendung gekommenen Methode der Ueberführung des Indols in pikrinsaures Indol auf grosse Genauigkeit keinen Anspruch machen kann, so kann dies allein die grosse Differenz nicht erklären; hier kann auch der vorher erwähnte Versuch von Salkowski herangezogen werden, der eine beträchtliche Indolzunahme bei der geringeren Alkalisierung erhielt.

Besser wird der Einfluss der Alkalien auf den Stoffwechsel der Fäulnisserreger sichtbar bei den Versuchen mit Fibrin, wo auch eine grössere Ausbeute der einzelnen Producte erhalten wurde.

B. Versuche mit Fibrin.

Käuliches Fibrin, welches mit Wasser ausgewaschen war, kam zu Verwendung. Dasselbe wurde durch Auspressen mit einem Handtuch möglichst vom Wasser befreit und dann gewogen.

Je 200 g derartig behandeltes Fibrin wurden mit 1 Liter Wasser, 0,2 g K_2HPO_4 und 0,1 g $MgSO_4$ ¹⁾ versetzt und 17 Tage bei 39—41° stehen gelassen. Der Kolben wurde mit einer 3 proc. Cyanquecksilberlösung (150 cem) in Verbindung gebracht.

Das Fibrin wurde versetzt: A. mit 8 cem, B. mit 32 cem und C. mit 48 cem 10proc. Na_2CO_3 Lösung.

Nach 20 Stunden ist die Fäulniss schwach entwickelt und keine Gasentwicklung in der Cyanquecksilberlösung bemerkbar.

Nach 48 Stunden ist die Fäulniss in allen Fällen gut entwickelt. Bei den Versuchen B. und C. hat eine Quellung des Fibrins stattgefunden.

A. Die Cyanquecksilberlösung ist trübe, B. und C. ist klar.

Nach 96 Stunden: A. Beginn eines schwarzen Niederschlages in der Quecksilberlösung. B. Die Quecksilberlösung hat sich getrübt. C. Keine Gasentwicklung.

Nach 120 Stunden: A. Ziemlich reichlich schwarzer Niederschlag. B. Ganz geringer schwärzlicher Niederschlag. C. Nichts.

Bei Beendigung der Zersetzung nach 17 Tagen hatte sich in den Quecksilberlösungen A. und B. ein schwarzer Niederschlag gebildet; daneben war ein schwacher Geruch nach faulem Kohl zu bemerken. Die Quecksilberlösung C. war vollkommen klar und anscheinend unverändert geblieben.

Nun wurde überall eine neue, 3proc. Cyanquecksilberlösung vorgelegt und die Austreibung der Gase in der oben geschilderten Weise vernommen.

1) Salzgemisch nach Salkowski, Zeitschrift für physiol. Chemie. VIII. S. 43.



Bei Versuch A. und B. verlief dies folgendermaassen:

Zuerst entwickelte sich nur Quecksilbermercaptid, an dem gelblich grünen Häutchen auf der Lösung und dem grünen Niederschlag kenntlich. Als schwarzes Quecksilbersulfid auszufallen beginnt, was nach einer Stunde der Fall war, wird sofort die Vorlage gewechselt. Bei A fällt nun ein schwarzer Niederschlag bis zum Schluss aus; bei B. ein dunkelgrüner, mit schwarzen Partikeln durchsetzter. Beim Versuch C. bleibt die Cyanquecksilberlösung noch einige Minuten nach Beginn des Austreibens der Gase völlig klar. Nach 20 Minuten beginnt ein spärlich rein gelbgrüner homogener Niederschlag auszufallen. Nach $1\frac{1}{2}$ Stunden war in allen Fällen die Austreibung der Gase beendet. In der während der Dauer der Zersetzung vorgelegten Quecksilberlösung war an Niederschlag enthalten:

A. 0,5570 g und B. 0,1056 g Niederschlag, C. kein Niederschlag.

Der Niederschlag bestand aus einer schwarzen homogenen Masse. Bringt man ihn, was seiner Beschaffenheit nach geschehen musste, als HgS in Anrechnung, so ergibt sich an Schwefelwasserstoff:

A. 0,082 g. B. 0,019 g. C. kein Schwefelwasserstoff.

Bei der Austreibung der Gase wurde erhalten in der ersten Vorlage:

A. 1,2055 g, B. 0,5425 g, C. 0,0940 g.

Der Niederschlag war grün. Beim Trocknen über H_2SO_4 ballte er sich zu kleinen dunkleren Klümpchen zusammen. Der Niederschlag war seiner Natur nach Quecksilbermercaptid. Daraus ergab sich an Mercaptan: A. 0,198 g. B. 0,090 g. C. 0,015 g.

Die zuletzt vorgelegte Cyanquecksilberlösung ergab an Niederschlag:

A. 0,020 g. B. 0,1435 g. C. kein.

Die Niederschläge waren nicht homogener Beschaffenheit. Doch handelte es sich im Versuch A. vorwiegend um HgS , so dass ich ihn als Schwefelwasserstoff in Anrechnung brachte.

Der Niederschlag im Versuch B. war vorwiegend grün; ich glaubte ihn deshalb mit einem nur kleinen Fehler, der die weitere Ueberführung in Bleilösung als überflüssig erscheinen liess, als Quecksilbermercaptid verrechnen zu können. Es ergab sich:

A. 0,003 g Schwefelwasserstoff. B. 0,023 g Methylmercaptan.

Addirt man die einzelnen Resultate, so ergibt sich an Schwefelwasserstoff:

Versuch A. 0,085 g, B. 0,019 g, C. kein.

Methylmercaptan:

Versuch A. 0,198 g, B. 0,113 g, C. 0,015 g.

An Phenol wurde gefunden:

Versuch A.: 3,0034 g Tribomphenol (meist Kresol), daraus berechnet 0,853 g Phenol (meist Kresol). — Versuch B: 2,8418 g Tribomphenol, daraus 0,808 g Phenol. Versuch C: 2,9208 g Tribomphenol, daraus 0,830 g Phenol.

Bei der Ansäuerung des Destillats zum Nachweis des Phenols mit HCl bleibt die Lösung A. und B. klar, C. färbt sich intensiv rosa. Die Destillate reagierten vorher alle alkalisch: ob die Alkaleszenz im Destillat C. grösser als in den Destillaten A. und B. war, was der stärkeren Alkalisierung des Versuchs C. (48 cem 10 pCt. Na_2CO_3) entspräche, und ob es sich um die oben beschriebene Rosafärbung Indolhaltiger Flüssigkeiten beim Zusatz von NaOH und HCl handelt, ist nicht weiter verfolgt worden.

Es wurden hier noch einige Versuche gemacht, um zu controliren, ob bei der Destillation des Phenols alles Phenol ins Destillat übergegangen war, oder ob der Rückstand noch Phenol enthielt.

Dieses zurückgebliebene Phenol musste dann im Destillat der flüchtigen Säuren vorhanden sein. Eine Probe desselben wurde mittelst HCl und Bromwasser auf Phenol geprüft. Es wurde nie etwas gefunden.

Es geht also alles Phenol in das erste Destillat über.

Im Versuch A. wurde meist Tribromkresol erhalten; im Versuch B. und C. reines Tribromphenol.

Bei der Indolbestimmung wurde, wie schon erwähnt, ein Theil des Destillats A. und B. 300 cem zur Bestimmung des Indols als pikrinsaures Indol verwandt. Im Rest wurde das Indol als solches gewogen. Im Versuch C. wurde das ganze Indol als pikrinsaures Indol dargestellt.

A.: Indol direct gewogen, für das Ganze berechnet 0,472 g, als pikrinsaures Indol berechnet für das Ganze 0,365 g. — B.: Indol direct gewogen, für das Ganze berechnet 0,4176 g, aus pikrinsaurem Indol 0,215 g. — C.: Indol als pikrinsaures Indol für das Ganze bestimmt 0,187 g.

Ammoniak: A. 2,9999 g. B. 2,394 g. C. 2,425 g.

An flüchtigen Säuren wurden erhalten: Halbnormallauge sättigend A.: 250,25 cem. B.: 284,0 cem. C.: 313,0 cem.

An nicht flüchtigen Säuren, Halbnormallauge sättigend: A.: 111,5 cem. B.: 140,5 cem. C.: 150,0 cem.

Unzersetztes Eiweiss: A. 1,898 g. B. 1,0175 g. C. 1,2903 g.

Betrachtet man nun die oben geschilderten Versuche, so ergibt sich daraus Folgendes für den Einfluss des Alkali auf den Stoffwechsel der Fäulnisserreger.

1. Mercaptan.

Bei der Mercaptanbildung haben sich nicht nur in Bezug auf die Quantität der unter den Einfluss der Alkalien gebildeten Substanz, sondern auch in Bezug auf die Zeit der Entstehung interessante Resultate ergeben. Während bei der Rindfleischfäulniss bereits nach 20 Stunden bei 7 cem Alkalizusatz Mercaptan sich spontan ausschied, war es bei 30 cem Alkalizusatz mit Sicherheit erst nach 72 Stunden zu erkennen. Wenn trotzdem die schliesslich erhaltene Quecksilbermenge im Versuch II 30 cem Alkali) nur unwesentlich gegen I. zurückblieb, so kann dies entweder daran liegen, dass sich im Versuch II. das Mercaptan und der H_2S erst später, dann aber um so stärker gebildet hatte, oder aber dass sie sich zwar gleichmässig gebildet hatten, aber erst später durch den Einfluss des Alkalis zur spontanen Ausscheidung kamen. Dass eine Zurückhaltung von gebildetem Mercaptan stattfinden kann, beweisen die Versuche an Fibrin. Hier ist in keinem Falle eine deutliche spontane Mercaptanausscheidung beobachtet worden, obwohl sich im Versuch A. 2degr. dieses Gases gebildet hatten. Interessant sind die Fibrinversuche auch in sofern, als hier zum ersten Male aus Fibrin grössere Mengen Mercaptan dargestellt werden konnten. Rubner hat Fibrin mit Kali geschmolzen und erhielt nur unsichere Spuren. Hier wurden im Versuch A. 0,2 g Methylmercaptan erhalten. Nach vielen Analysen, die E. und H. Salkowski zur Bestimmung des Eiweissgehaltes im feuchten Fibrin angestellt hatten, kann man ohne grossen Fehler die Eiweissmenge für 200 g feuchtes Fibrin auf 50 g anschlagen. Daraus resultirt in unsern Versuchen ein

Schwefelgehalt für die angewandte Fibrinmenge von 0,6 g. Da nun $\frac{2}{3}$ des Methylmercaptans S ist, so ist 0,134 g S im Methylmercaptan wiedergefunden worden oder 22,7 pCt. des im Fibrin enthaltenen Gesamtschwefels. Es hatte also Fibrin eine Ausbeute an Methylmercaptan geliefert, wie sie höher von Eiweisskörpern nur noch bei der Kalischmelze von Liebig's Fleischextract von Rubner erhalten wurde.

Gerade hierbei zeigt sich die Bedeutung des Alkalis für den Stoffwechsel der Mikroben, zumal wenn wir die Resultate der Versuche B. und C. mit A. vergleichen.

Im Versuch B. wurde bei einem Alkalizusatz von 32 cem Na_2CO_3 -Lösung nur noch 12,7 pCt. des Gesamtschwefels in Methylmercaptan wiedergefunden; im Versuch C. nur noch 1,6 pCt.

Betrachtet man diese Resultate, so wird es verständlich, dass früher bei der Fibrinfäulniss nie eine sichere Menge von Mercaptan gefunden worden ist. Dies hatte also seinen Grund in zweierlei:

1. Ist bei der Fibrinfäulniss in der Cyanquecksilberlösung nie eine spontane Mercaptanausscheidung beobachtet worden. Dieselbe trat erst bei Anwendung der Wasserstrahlluftpumpe auf.

2. Wurden bei den früheren Versuchen, soweit ersichtlich grössere Mengen Alkali angewandt, als im Versuch A. und B. zur Verwendung kamen. E. und H. Salkowski z. B. haben bei ihren Versuchen zur Indolbestimmung bei der Fäulniss auf 8 Liter Wasser 200—240 cem kaltgesättigte (16 pCt.) Na_2CO_3 angewandt. Das entspräche für meine Versuche einer Alkalimenge von 40—50 cem der von mir angewandten Lösung.

2. Schwefelwasserstoff.

Ebenso wie Mercaptan steht Schwefelwasserstoff unter dem Einfluss des Alkali. Die Versuche mit Rindfleisch können hier nicht herangezogen werden, da die H_2S -Bestimmung verunglückte.

Bei den Versuchen mit Fibrin ist im Versuch A. 0,085 g H_2S oder 0,080 g Schwefel gefunden worden.

Im Versuch B. nur 0,019 g H_2S oder 0,0179 g Schwefel. Im Versuch C. ist überhaupt kein Schwefelwasserstoff gefunden worden.

Aus diesen Versuchen geht hervor:

1. Die Mercaptan- und die Schwefelwasserstoffbildung der Fäulniserreger ist in hohem Grade abhängig von dem Alkaligehalt der Mischungen; ein Zuviel von Alkali kann die Schwefelwasserstoffbildung völlig hindern.

2. Der bisher gewohnheitsmässig angewandte Alkalizusatz zu den Fäulnismischungen war Schuld, dass bisher

nie bei der Fibrinfäulniss mit Sicherheit Mercaptan nachgewiesen werden konnte. Es entsteht reichlich Methylmercaptan aus Fibrin. 22,7 pCt. des im Fibrin enthaltenen Schwefels ist als Mercaptan wiedergefunden worden.

3. Die von Sieber und Schoubenko¹⁾ gefundene Thatsache, dass überall, wo von den Mikroben zugleich Mercaptan und Schwefelwasserstoff gebildet werden, das erstere bei weitem den letzteren überwiegt, ist durch die vorliegenden Versuche bestätigt worden.

3. Indol und Phenol.

In Bezug auf die Quantität des gebildeten Phenols konnte kein Einfluss des Alkalis constatirt werden; nur war es auffallend, dass im Versuch A. Kresol, in B. und C. Phenol erhalten wurde. Ob dies dem Einfluss des Alkalis zugeschrieben werden muss, oder nicht, kann nach dem einen Resultat nicht entschieden werden. Die Indolbildung steht, wie schon E. und H. Salkowski vermutheten, entschieden unter dem Einfluss des Alkalis. Dieser Einfluss macht sich in gleichem Maasse wie bei der Mercaptanbildung geltend, indem bei einem geringen Alkalizusatz die Indolbildung stärker, als bei einem starken Zusatz zu sein scheint.

4. Bestimmung der Säuren.

Sowohl die Bildung der flüchtigen Säuren (Ameisen-, Essigsäure etc.) als auch der nicht flüchtigen (Skatol-Carbonsäure, Bernsteinsäure, Oxy-säuren etc.) ist in hohem Maasse von dem Zusatz von Alkali zu den Zersetzungsmaterial abhängig.

Und zwar wurde, je mehr Alkali zugesetzt wurde, desto mehr Säure gefunden. Aber wenn auch der grössere Zusatz von Alkali eine Vermehrung der Gesamtsäurebildung bedingt, so ist dies für die einzelnen Säuren keineswegs in gleicher Weise der Fall. Im Gegentheil ist für die Bernsteinsäure früher festgestellt worden, dass bei einem Versuch mit der 4fachen Alkalimenge nur noch der 10. Theil der Quantität entstand, die bei einem Zusatz von $7\frac{1}{2}$ cem 16 proc. Na_2CO_3 -Lösung zu einem Liter Flüssigkeit erhalten wurde. Demnach müssen die einzelnen Säuren in durchaus verschiedener Weise in ihrer Bildung aus eiweisshaltigem Material vom Alkali abhängig sein. Dies genauer zu untersuchen war bei dem Fehlen genügender Trennungsmethoden sehr schwierig. Auch lag für mich kein Grund vor, alle diese Untersuchungen vorzunehmen, da es mir bei diesen Versuchen nur darauf ankam festzustellen, ob überhaupt unter dem Einfluss des Alkalis der Stoffwechsel der Mikroben sich ändert oder nicht.

1) Monatshefte für Chemie. Bd. X. 1889.

5. Eiweissrückstand.

Um festzustellen, ob das Alkali einen Einfluss auf die Intensität der Zersetzung hatte, war es nöthig zu wissen, wieviel Eiweiss unzersetzt geblieben war, da es sich ja hier nur um rein eiweisshaltiges Material handelte. Die vorstehenden Versuche zeigen, dass innerhalb der hier mit dem Alkalizusatz innegehaltenen Grenzen sich kein Einfluss auf die Intensität der Zersetzung der Fäulnisserreger geltend macht. Wenigstens sind die erhaltenen Unterschiede zu gering, als dass sie nicht innerhalb der vorhandenen Fehlergrenzen fallen. Die Fehlerquellen liegen in der Zusammensetzung des Zersetzungsmaterials, in der Summe des durch die Bakterienvermehrung zugeführten Eiweiss und in der Untersuchungsmethode.

Aus dieser Gleichartigkeit der Intensität der Zersetzung ergeben sich die wichtigen Thatsachen,

1. dass man aus der Intensität der Zersetzung allein nichts schliessen kann auf die Menge der einzelnen gebildeten Stoffwechselproducte,

2. dass trotz gleicher Intensität der Zersetzung die Quantität der einzelnen gebildeten Stoffwechselproducte der Fäulnisserreger erheblich schwankt, und zwar unter dem Einflusse des Alkaligehalts des Zersetzungsmaterials.

C. Versuche mit Reinculturen.

Bei der Untersuchung des Stoffwechsels der Fäulnisserreger handelte es sich um Mischculturen. Es war hierbei die Möglichkeit vorhanden, dass einzelne Arten der Fäulnisserreger auf Kosten anderer bevorzugt resp. benachtheiligt würden, wenngleich dies sehr unwahrscheinlich war, da die Intensität der Zersetzung in allen Fällen als gleichmässig sich erwies. Diese Gleichmässigkeit der Zersetzung wäre doch wunderbar, wenn die Zersetzung in den einzelnen Fällen durch ganz verschiedene Arten Mikroben veranlasst wäre. Trotzdem schien es nöthig zu sein, den Einfluss des Alkalis auf den Stoffwechsel der Mikroben auch bei Reinculturen festzustellen.

Es wurden deshalb mit Reinculturen von *Bact. coli comm.* Versuche angestellt. Diese wurden von Bouillon auf Gelatine übergeimpft und 4 Wochen bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Von dieser Gelatine wurden 3 Oesen auf eine Peptonlösung übergeimpft, welche folgendermassen bereitet war:

20 g käufliches Pepton wurde in einem Liter Wasser gelöst, mit einer variirten Menge Alkali versetzt und sterilisirt;¹⁾ darauf mit 3 Oesen der oben genannten Gelatine mit *Bacterium coli-Reincultur* beschickt.

1) Der Kolben, welcher die Peptonlösung enthielt, war mit dem ganzen Apparat sterilisirt worden, der nöthig war, um die eventuell gebildeten Gase auszutreiben, ohne den Kolben vorher zu öffnen.

Nach der Impfung wurde der Kolben geschlossen und in den Wärmeschrank gesetzt, dessen Temperatur constant 39–41 betrug, nachdem er vorher mit einer 3 proc. Cyanquecksilberlösung in Verbindung gebracht war. Die Methode war im grossen und ganzen dieselbe, wie bei den Fäulnismischungen, wo sie abweicht, ist es besonders angegeben.

Versuch A. 20 g Pepton in 1 Liter Wasser gelöst und mit 8 ccm 10 proc. Na_2CO_3 versetzt. 3 Oesen Gelatinereincultur.

Versuch B. ebenso, jedoch mit 32 ccm 10 proc. Na_2CO_3 versetzt.

Versuch C. „ „ „ 48 „ 10 „ Na_2CO_3 „

Die Dauer der Zersetzung betrug in allen 3 Versuchen 20 Tage. Bei keinem Versuche hatte sich während der Zersetzung etwas in der Cyanquecksilberlösung gebildet. Um zu controliren, ob sich in den Kolben die Reincultur bewahrt hatte, wurde, ehe zur Verarbeitung geschritten wurde, von jedem eine Platte gegossen. Es fanden sich stets auf der Platte nur Colonien von Bact. Coli. Nach Austreiben der Gase mit der Wasserstrahlpumpe wurde gefunden an reinem Quecksilbermercaptid A. 0,0 22g. B. nichts. C. 0,0735 g.

Es wurde im Versuch B. versucht, aus dem erhaltenen, schwärzlichen Niederschlag das eventuell vorhandene Mercaptan durch Ueberführen in 3 proc. Bleizuckerlösung zu isoliren. Es wurde nichts erhalten.

Der in B. erhaltene Niederschlag erwies sich als Quecksilbersulfid. Er betrug 0,108 g.

An Indol, welches als solches gewogen wurde und den oben erwähnten Jasmingeruch zeigte, wurde erhalten: A. 0,045 g. B. 0,049 g. C. 0,061 g.

Als Tribromphenol wurde erhalten: A. 0,340 g. B. 0,192 g. C. 0,226 g.

An flüchtigen Säuren ergab sich Halbnormallauge sättigend: A. 2,9 ccm. B. 8,2 ccm. C. 77,4 ccm.

An nicht flüchtigen Säuren Halbnormallauge sättigend, ergab sich: A. 6,5 ccm. B. 9,3 ccm. C. 48,0 ccm.

Die Titration der flüchtigen sowohl, wie der nicht flüchtigen Säuren wurde unter Zusatz von Lakmus vorgenommen, da Rosolsäure sich als nicht brauchbar erwies.

Die nicht flüchtigen Säuren wurden, wie das oben angegeben ist, in ätherhaltigen Lösungen, die mit Wasser verdünnt waren, titirt.

Zum qualitativen Nachweis einzelner nicht flüchtiger Säuren wurden die nicht zur Titration gebrauchten 200 ccm ätherhaltiger Lösung durch Destillation vom Aether befreit und der Rückstand auf dem Wasserbade eingedampft. So wurde eine schmierige, stark nach Hydrozinmssäure riechende Masse erhalten, welche mit Bleioxydhydrat (2–3 Messerspitzen) gekocht und zur Trockne verdampft wurde. Der Rückstand wurde mit kaltem Wasser behandelt, worin bernsteinsaures Bleioxyd so gut wie unlöslich ist, filtrirt und Filtrat und Rückstand besonders behandelt.

Das Filtrat wurde mit H_2S entbleit, vom Schwefelblei abfiltrirt, und das Filtrat eingedampft. Es wurde im Versuch C. eine ölige Masse erhalten; doch zu wenig, um sie genauer untersuchen zu können. Im Versuch A. und B. bekam ich nur ganz geringe Schmierien.

Der Bleioxydrückstand mit Eisessig übergossen und filtrirt, wurde dann gleichfalls mit H_2S entbleit etc.

Hier erhielt ich im Versuch C. grosse Mengen Oxyssäuren neben Bernsteinsäure.

Im Versuch A. und B. wurden neben Spuren von Oxyssäuren gleichfalls Spuren von Bernsteinsäure erhalten.

Um die letztere genauer identificiren zu können, wurde der Rückstand abwechselnd mit Aether und Alkohol zu gleichen Theilen und dann mit Wasser umkrystallisirt; schliesslich wurde derselbe auf Thonplatten gebracht. Der auf denselben

erhaltene Rückstand genügte zur Hustenprobe und zur Probe mit neutr. Bleiacetat. Durch beide Proben war die Bernsteinsäure als solche genügend charakterisirt.

Unzersetztes Pepton.

Der Nachweis der Quantität des Peptonrückstandes machte grosse Schwierigkeiten, da das mit Alkohol gefällte Pepton eine zähe, klebrige Masse bildete, welche auf dem Filter mit heissem Wasser übergossen nur unvollkommen und unter Anwendung erheblicher Quantitäten Wasser (500 ccm) sich löste.

Ich erhielt, nachdem ich 20 ccm davon zur N-Bestimmung abgenommen hatte, aus diesen 20 ccm des Versuchs A

0,05876 N. Dies mit $\frac{500}{20} = 25$ multiplicirt ergibt 1,4690 N.

Zur Berechnung des Peptons muss dies mit $\frac{100}{16,18}$ (N. im Pepton) = 6,19 multiplicirt werden = 9,093 g Pepton.

Versuch B. $0,07491 \text{ N} \times 25 = 1,87275 \text{ g N} \times 6,19 = 11,592 \text{ g Pepton.}$

Versuch C. $0,052 \text{ g N} \times 25 = 1,30 \text{ g N} \times 6,19 = 8,047 \text{ g Pepton.}$

Flüchtige Säuren.

Die flüchtigen Säuren wurden noch etwas genauer untersucht. Dies geschah nach der von Hoppe-Seyler (Handbuch der Phys. Chem. Analyse Seite 78--83) angegebenen Methode.

Versuch A. Das Resultat war ein rein negatives. Es lag dies an der zu geringen Ausbeute.

Versuch B. Bei der Darstellung der mit Baryt fällbaren flüchtigen Säuren wurde ein starker Buttersäuregeruch wahrgenommen. Doch war die Ausbeute so minimal, dass an eine Barytbestimmung nicht zu denken war.

Versuch C. Es wurde auch hier weder Ameisen-, noch Essigsäure gefunden. Bei der Barytbestimmung erhielt ich 0,1749 g Barytsalz; nach der Verbrennung betrug der Rückstand = 0,0454 g = 38,49 pCt. des Barytsalzes.

Diese Zahl liegt zwischen dem Antheil der Baldrian- und Capronsäure am Barytsalz. Es handelte sich hier sehr wahrscheinlich um ein Gemisch derselben. Die Quantität des erhaltenen Barytsalzes entspricht keineswegs der gesammten Menge, da nicht das ganze Destillat, sondern nur etwa die Hälfte bei der Barytbestimmung in Frage kam. Es handelte sich für mich ja nur darum, festzustellen, welche flüchtigen Fettsäuren hier aus Pepton durch Bact. coli gebildet werden können. Ich habe hier unter gewissen Bedingungen, d. h. bei einem Alkalizusatz von 48 ccm Natriumcarbonatlösung zu 1 Liter Peptonlösung, Baldriansäure und Capronsäure gefunden; es soll damit nicht geleugnet werden, dass noch andere höhere Fettsäuren durch Bact. coli aus Pepton gebildet werden können. Soviel aber geht aus diesen Versuchen mit Sicherheit hervor, dass bei derartigen Untersuchungen sehr auf den Alkaligehalt der Mischungen geachtet werden muss und dass man bei einer derartigen Untersuchung nicht unter den Alkaligehalt des Versuchs C. heruntergehen darf, um überhaupt zu einem Resultat zu gelangen. Man sieht also daraus, dass auch der Stoffwechsel von Reinculturen

abhängig ist vom Alkaligehalt des Zersetzungsmaterials. Auffallend ist ferner die Mercaptan-Ausbeute. Während die Versuche A. und C. reines Quesksilbermercaptid lieferten, ist im Versuch B. nur Quecksilbersulfid gefunden worden. Diese Erscheinung kann garnicht oder nur aus dem Alkaligehalt der Mischung erklärt werden. Hier sei noch bemerkt, dass bei der Gas austreibung bei allen drei Versuchen ein chokoladenartiger Geruch in der Cyanquecksilberlösung wahrgenommen wurde. Im Versuch A. wurde nach der Mercaptan-Austreibung noch eine Menge glänzender Krystalle in der Cyanquecksilberlösung erhalten. Diese etwa einige Centigramm wurden isolirt aufgefangen, gaben aber für ihre Bestimmung keinen Anhaltspunkt.

Die Intensität der Zersetzung war keine so gleichmässige wie bei der Fäulniss; aber wenn man die Fehlerquellen, die hier durch die oben genannten Missstände bei der Lösung des Peptons in Betracht kamen, berücksichtigt, so kann auch bei Zersetzungen durch Reinculturen dem Alkali innerhalb der hier beobachteten Grenzen kein besonderer Einfluss auf die Zersetzungsfähigkeit der Mikroben zugeschrieben werden. Es tritt auch bei diesen Versuchen mit Reinculturen, wenn auch etwas weniger deutlich als bei der Fäulniss, das Ergebniss zu Tage, dass die Quantität der einzelnen gebildeten Stoffwechselproducte abhängig ist von dem Alkaligehalt der Mischungen.

D. Versuche mit Milch.

Von einer Portion Kuhmilch, welche amphotere Reaction zeigte, wurden:

I. 500 cem in einen Kolben gefüllt, derselbe mit einem Wattebausch verstopft und zwei Stunden sterilisirt.

II. 500 cem mit 4 cem 10proc. Na_2CO_3 lösung versetzt, mit einem Wattebausch verstopft und ebenfalls zwei Stunden sterilisirt.

III. 500 cem mit 6 cem 10 proc. Na_2CO_3 im Kolben versetzt, ebenfalls zwei Stunden sterilisirt.

Nach der Sterilisation hatten II. und III. eine braune Färbung angenommen, wohl infolge des Einflusses des Alkalis auf Milchzucker.

Nach der Sterilisation wurden alle drei Kolben mit je 2 Oesen einer zwei Monat alten Reincultur von *Bact. coli comune* beschickt.

Nach 24 Stunden war in allen Fällen die Milch coagulirt, doch derartig, dass die amphotere Milch (Versuch I.) bereits eine völlige Trennung des Milchserums von den festen Bestandtheilen zeigte, während II. nur wenig und III. nur die Anfänge einer Coagulation zeigte. Nach 48 Stunden war in II. die Coagulation vollständig, nach 96 Stunden in III. Nach 24 Tagen wurde die Untersuchung begonnen, nachdem vorher zur Controle aus jeder Milch Gelatinröhrchen geimpft waren, von denen Platten gegossen wurden. Die Platten des Versuchs I. und II. blieben steril, diejenigen von III. zeigten einige Colonieen, die sich sehr langsam entwickelten, aber sonst vollkommen den Typus von *Bact. coli* zeigten. Bei der Oeffnung der Kolben entströmte ein Geruch wie noch von ganz frischer Milch; keine Spur eines käseartigen oder sauren Geruches.

Es wurde in allen drei Versuchen weder Mercaptan, noch Schwefelwasserstoff, noch Indol und Phenol gefunden.

Dagegen konnte Alkohol und mit Wahrscheinlichkeit Aldehyd in allen drei Versuchen nachgewiesen werden, in dem zur Gewinnung des Indols und Phenols erhaltenen Destillate; und zwar durch folgende Reactionen:

1. 10 cem Destillat; dazu ein gleiches Volumen H_2SO_4 und einige Tropfen chromsaures Kali. Beim Erhitzen starke Grünfärbung unter Bildung von Chromoxyd.
2. 10 cem Destillat; dazu Jodjodkalium und NaOH; Jodoformgeruch und Niederschlag von Jodoform.

3. Gunning-Reynold'sche Probe positiv.

4. Chautard'sche Probe positiv.

5. Tollens'sche Silberprobe positiv.

Dagegen war auffallender Weise die Probe mit Nitroprussidnatrium und NaOH. (Legal'sche Probe) stets negativ.

Die Destillate der Milch waren so gewonnen, dass die ganze zersetzte Milch, also 500 cem ohne Aenderung der Reaction (sauer) der Destillation unterworfen wurde.

Es wurden erst 250 cem abdestillirt, dann noch 200 cem. Wasser zum Rückstand zugefügt und nochmals 250 abdestillirt. Von dem Destillat, welches nun 500 betrug, wurden 100 cem zum Nachweis von Phenol verwandt (negativ). Da die Choleraroth-Reaction nach Salkowski'scher Vorschrift, ebenso wie die Reaction mit NaOH und HCl negativ waren, so wurde nicht weiter auf Indol gefahndet, sondern auf Alkohol und Aldehyd. Der Rest, etwa 200 cem, wurde zur Jodoformbestimmung verwandt, um einen Maassstab für die Menge des gebildeten Alkohols und Aldehyds zu haben. Es wurde gefunden:

Versuch I.	Jodoform	0,0212 g	} In allen Fällen für das Ganze berechnet.
" II.	"	0,0174 "	
" III.	"	0,0190 "	

Die Darstellung des Jodoforms geschah in der Weise, dass zu den 200 cem Destillat 15 cem Jodjodkalium und 25 NaOH hinzugefügt und 24 Stunden stehen gelassen wurde. Das ausgefallene Jodoform wurde abfiltrirt und mit einzelnen Portionen Aether (stets einige Tropfen) gelöst, in ein gewogenes Uhrglas filtrirt und der Aether verdunstet.¹⁾ Das Uhrglas wurde über Schwefelsäure getrocknet und gewogen. Die Differenz war Jodoform.

An flüchtigen Säuren wurde gefunden:

Versuch I. missglückte.

 " II. 20,8 cem Halbnormallauge sättigend.

 " III. 40,0 " " "

Die flüchtigen Säuren wurden ebenso wie bei der Fäulniss erhalten. Nur betrug hier der wässrige Rückstand, der mit 25 cem (50 cem bei der Fäulniss) verdünnter Schwefelsäure angesäuert wurde, 250 cem. Davon wurden 200 abdestillirt, dann nochmals 200 cem Wasser zum Rückstand zugefügt und nochmals 200 abdestillirt, im Ganzen 400 cem. Davon wurden 50 cem abgenommen, und mit Halbnormallauge unter Zusatz vom Lakmus titrirt. Es wurden verbraucht:

Versuch II. 2,6 cem Halbnormallauge sättigend $\times 8 = 20,8$ cem

 " III. 5,0 " " " $\times 8 = 40$ "

Der Nachweis der nicht flüchtigen Säuren geschah genau wie beim Pepton.²⁾ Es wurde erhalten im Ganzen:

1) Vergl. E. Salkowski, Pflüger's Arch. 56. S. 340.

2) s. S. 19.

Versuch I. 17,0 cem Halbnormallauge sättigend.

„ II. 20,5 „ „ „

„ III. 22,76 „ „ „

Unter den nicht flüchtigen Säuren wurde Milchsäure erwartet, und es erschien interessant, die gewonnene Quantität derselben in den einzelnen Versuchen festzustellen.¹⁾ Es wurde deshalb die nicht titrirte Aetherlösung der Destillation unterworfen, und der Rückstand eingedampft. Derselbe enthielt obige Schmieren und eine erhebliche Menge Krystalle, in welchen Bernsteinsäure vermuthet wurde.

Zur genaueren Untersuchung wurde der Rückstand in Wasser gelöst auf ein bestimmtes Volumen gebracht 150 cem.

50 cem zur Milchsäurebestimmung und 100 cem zur Bernsteinsäurebestimmung verwandt.

Zur Bestimmung der Milchsäure wurde nach Salkowski-Leube, Lehre vom Harn Seite 126 verfahren; nur wurde der mit Bleioxydhydrat erhaltene Rückstand mit Wasser, statt mit abs. Alkohol gelöst, da bernsteinsaures Bleioxyd in Wasser unlöslich ist und es hier sich um Trennung von eventuell vorhandener Milchsäure neben Bernsteinsäure handelte.²⁾ Es wurde keine Milchsäure gefunden. Zur Bestimmung der Bernsteinsäure wurde der für ihren Nachweis abgemessene Theil zur Trockne eingedampft und da er noch viel Schmieren enthielt, zur Reinigung abwechselnd mit Wasser und einem Gemisch von Aether und Alkohol zu gleichen Theilen ausgezogen. Der so von den Schmieren gereinigte Rückstand wurde auf Thonplatten gebracht, nach 24 Stunden abgenommen, $1\frac{1}{2}$ Stunde bei 80 Grad getrocknet und gewogen.

Versuch I. Es wurde gefunden: 0,3178 g Substanz.

Dies war aber nur, da von 150 cem nur 100 cem auf Bernsteinsäure verarbeitet wurden, $\frac{2}{3}$ der auf Milch- und Bernsteinsäure untersuchten Menge. Mann muss also zu dem erhaltenen Resultate noch $\frac{1}{3}$ des Resultats hinzuaddiren, 0,1060 g. Damit erhöht sich die gefundene Menge auf 0,4238 g. Da aber im Anfang von der Gesamtätherlösung (250 cem) 50 cem zur Bestimmung der nicht flüchtigen Säuren durch Titration verwandt waren, so ist noch $\frac{1}{4}$ der zuletzt erhaltenen Menge zu dieser hinzu zu addiren = 0,1058, Gesamteresultat 0,5296 g.

Dieser Rückstand gab sämtliche Reactionen auf Bernsteinsäure³⁾, Schmelzpunkt 179 Grad. Der Schmelzpunkt der Bernsteinsäure liegt bei 180 Grad. Es handelte sich also um fast völlig reine Bernsteinsäure.

Versuch II. erhaltene Menge:

0,3444 g, dazu kam

$$\frac{1}{3} = \frac{0,1148}{0,4592} \text{ g und}$$

$$\frac{1}{4} = \frac{0,1148}{0,5740} \text{ g. Ebenfalls Bernsteinsäure. Schmelzpunkt 174 Grad.}$$

1) Alle Autoren melden übereinstimmend, dass Bact. coli Glykose und Laktosegährung verursacht. Genaueres findet sich in der Arbeit von Blachstein, Archiv des sciences biolog. p. p. l'institut impérial de médecine. Petersbourg 1892. S. 199. Derselbe berichtet in seiner Arbeit über die Biologie des Typhusbacillus auch über Stoffwechselproducte von Bact. coli. Seine Angaben beruhen auf Untersuchungen von Bischler, welche damals und, so viel ich weiss, auch bis jetzt nicht publicirt worden sind. Es heisst p. 207: „M. Bischler a constaté une fermentation très énergique avec formation d'alcool éthylique et d'acide acétique, ainsi que d'acide paralactique dextrogyre.“

2) Virchow's Archiv. Bd. 137. 3. S. 550.

3) Ebenda S. 553.

Versuch III.

0,232 g und

 $\frac{1}{3} = 0,077$ "

0,309 g und

 $\frac{1}{4} = 0,078$ "

0,387 g Bernsteinsäure. Schmelzpunkt 176 Grad.

Es waren also, je nach dem Gehalt an Alkali aus 500 ccm Milch durch *Bacter. coli* zwischen 0,38 und 0,57 g Bernsteinsäure abgespalten worden. Es ist dies eine ganz ungewöhnlich hohe Menge dieser Säure, die ich übrigens, wenn auch nicht in so erheblichen Mengen, wiederholentlich in Milch bei der spontanen Zersetzung derselben gefunden habe. Auch gelang es mir früher einen Gelatine verflüssigenden *Bacillus* aus Milch zu züchten, der aus Milch in wenigen Tagen Bernsteinsäure abspaltete, ohne sicher nachweisbare Mengen von Milchsäure zu bilden. Damals glaubte ich, dass es sich um einen specifischen Bernsteinsäure bildenden *Bacillus* handelte, ähnlich wie der specifisch Milchsäure aus Milch bildende *Bacillus*. Ich glaubte dies um so mehr annehmen zu können, als ich in der Literatur keine Beobachtung fand, nach welcher Bernsteinsäure aus Milch durch Bakterien entsteht, obwohl die Zersetzung der Milch wiederholentlich studirt worden ist. Dazu kam noch, dass eine andere aus der Milch isolirte Bakterienart (vielleicht *Oidium lactis*), welche bekanntlich bei der spontanen Zersetzung derselben eine grosse Rolle spielt, keine sicheren Mengen von Bernsteinsäure lieferte. Es ist nach diesem Befund mit *Bact. coli* sicher, dass es viele Mikroben giebt, welche Bernsteinsäure aus Milch bilden. Denn es wäre doch ein sehr merkwürdiger Zufall, wenn gerade bei den beiden bisher von mir bei der Milch beobachteten Zersetzungen, der spontanen und der durch *Bacterium coli commune*, erhebliche Mengen Bernsteinsäure gefunden wurden, sonst aber diese Säure nie unter Einwirkung anderer Mikroorganismen aus Milch abgespalten werden könnte. Nach mündlicher Mittheilung hat E. Salkowski schon vor längerer Zeit in Milch, welche mit einem angeblichen Milchsäurebacillus geimpft war, ausschliesslich Bernsteinsäure gefunden und zwar diese in so grossen Mengen, dass sie beim Abdestilliren des Aethers in den Kolben selbst sofort rein auskrystallisirte, dagegen keine Milchsäure. Merkwürdig ist ferner der Umstand, dass ich weder bei der spontanen Zersetzung der Milch, noch bei der durch *Bacterium coli* Milchsäure gefunden habe, obwohl ich besonders auf Milchsäure geachtet habe. Es bedarf noch der Untersuchung, wann Milchsäure und wann Bernsteinsäure in der Milch entsteht. Und die Geneigtheit vieler Autoren, bei der Säurebildung in der Milch der Milchsäure den ersten Platz einzuräumen, ist, wenn nicht unbegründet, so doch sehr einzuschränken.

Die Entstehung der Bernsteinsäure aus Milch ist aber auch von

dem Alkaligehalt derselben abhängig. Die beste Ausbeute scheint man mit neutraler oder schwach alkalischer Milch zu erhalten.

Auch auf Verflüssigung der Gelatine hat, wie bekannt, ihr Alkaligehalt Einfluss. Ich benutzte Reinculturen jener von mir früher aus der Milch gezüchteten Bacillen, welche in ihrem morphologischen Verhalten einen Uebergang zu den Kokken darstellen und welche Gelatine verflüssigten. Und zwar impfte ich eine Platinöse stets aus derselben Cultur. Ich benutzte je vier verschiedene Gelatineröhrchen. Jedes Rohr enthielt 10 cem Gelatine. Es wurden angewandt:

1. Röhrchen einer neutralen Gelatine,
2. " " Gelatine, die auf 200 cem 2 cem 10proc. Na_2CO_3 -Lösung enthielt,
3. " " " " " 200 " 4 " " " " "
4. " " " " " 200 " 8 " " " " "

Alle Röhrchen zeigten bereits nach 24 Stunden starke gleichmässige Entwicklung.

Die Gelatine 4 begann sich nach 12 Tagen zu verflüssigen.

" " 3 " " " 15 " " "

" " 2 " " " 21 " " "

" " 1 " " " 22 " " "

Da angenommen wird, dass die Verflüssigung der Gelatine auf Peptonisirung beruht, so ist auch hier der Einfluss des Alkali auf letztere nachgewiesen.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, dass in der That das Alkali hervorragend den Stoffwechsel der Mikroben beeinflusst. Durchgehend tritt dies zu Tage bei der Säurebildung. Hier gilt der Satz, je mehr Alkali dem Zersetzungsmaterial beigegeben wird, desto mehr Säure wird gebildet. Wie weit man nach oben mit dem Alkalizusatz dabei gehen darf, ist nicht festgestellt worden; es dürfte dies wohl für jeden Mikroben sich verschieden gestalten.

Dieser Satz erfährt aber dadurch eine Einschränkung, dass zwar die Gesamtsumme der gebildeten Säuren durch ein Plus von Alkali sich erhöht, dass aber die einzelne Säure bei einem hohen Alkalizusatz in geringerer Quantität gebildet werden kann, als bei einem mässigen, wie dies für Bernsteinsäure nachgewiesen ist. Es scheint das Plus der nicht flüchtigen Säuren bei stärkerem Alkaligehalt der Mischungen bei der Eiweisszersetzung hauptsächlich auf das Conto der Oxyssäuren zu setzen zu sein. Der Mangel ausreichender Methoden zur quantitativen Bestimmung derselben hinderte die Untersuchung ins Einzelne auszudehnen. Man wird also, falls man einzelne Säuren bei Zersetzungen darstellen will, immer mehrere Versuche mit variirtem Alkaligehalt anstellen müssen, um nicht den Antheil derselben an den Zersetzungsproducten falsch zu taxiren. Ja es hat sich sogar gezeigt, dass das Entstehen einzelner Producte, wie H_2S , vollkommen unter dem Einfluss des Alkali verhindert werden kann und dass frühere Untersucher bezüglich der Mercaptanbildung aus Fibrin nur

darum zu einem negativen Resultat gelangten, weil der Alkaligehalt zu hoch bemessen war. Man wird also in Zukunft bei allen Zersetzungen dem Alkaligehalt der Mischungen einige Aufmerksamkeit schenken müssen, um nicht zu falschen Schlüssen in Bezug auf den Stoffwechsel der Mikroben zu gelangen. Es muss hier zugestanden werden, dass die vorliegenden Untersuchungen nur im Allgemeinen den Einfluss des Alkali auf den Mikroben-Stoffwechsel nachgewiesen haben, dass sie aber für die einzelnen Producte vielfach noch zu keinem abschliessenden Resultate gelangt sind. Z. B. hätte noch untersucht werden können, ob und wann bei der Fibrinfäulniss die Mercaptanbildung unter dem Einfluss des Alkali aufhört. Ferner, ob Kresolbildung aus Fibrin unter mässigem Alkalizusatz ein constanter Befund ist etc.

Ich bin leider durch äussere Umstände verhindert, fürs erste diese Untersuchungen fortzusetzen.

Ein zweites wichtiges Ergebniss ist, dass der Alkaligehalt nur unwesentlich, wenigstens innerhalb gewisser Grenzen, die Intensität der Zersetzung beeinflusst. Es ist damit erwiesen, dass die Fähigkeit der Bakterien Nährmaterial zu zersetzen, nichts zu thun hat, mit der quantitativen Bildung einzelner Stoffwechselproducte. Ob diese oder jene Producte besonders von den Bakterien gebildet werden, hängt nicht nur ab von den Lebensfähigkeiten derselben, sondern auch bei gleicher Vitalität der Bacillen in hohem Grade von dem Alkaligehalt des ihnen zur Zersetzung dargebotenen Materials. Deshalb war es anzunehmen, dass dies auch für die Toxinbildung zutrifft.

Bei derartigen Untersuchungen musste man sich des Thierkörpers als Reagens bedienen, da nur die Stärke der Symptome bei den mit Bakterienstoffwechselproducten behandelten Thieren einen Massstab bot für die Giftigkeit der durch die Bakterien unter Alkalieinfluss hervorgerufenen Zersetzungen. Am meisten geeignet zu diesen Untersuchungen erschien mir *Bact. coli*, weil ich für dieses vielfache Unterschiede der Stoffwechselproducte abhängig von der Alkalesceenz nachgewiesen habe.

E. Versuche an Thieren.

Je 250 ccm Bouillon wurden A. mit 2 ccm 10proc. Na_2CO_3 -Lösung, B. mit 8ccm 10proc. Na_2CO_3 -Lösung, C. mit 12 ccm 10proc. Na_2CO_3 -Lösung versetzt, dann $1\frac{1}{2}$ Stunden sterilisirt und mit 1 Platinöse einer Reincultur von *Bacterium coli* in Bouillon geimpft, welche ich der Güte des Herrn Prof. M. Wolff verdanke. Die so geimpfte Bouillon wurde in kleinen Kölbchen 25 Tage der Entwicklung im Thermostaten bei 39° überlassen.

Bouillon A. ist nach 24 Stunden trübe und zeigt längs der Glaswand einen für *Bact. coli* charakteristischen bläulichen Rand.

Bouillon B. Nach 24 Std. dieselbe anscheinend etwas schwächere Entwicklung.

Bouillon C. ist nach 24 Std. völlig klar, erst nach 48 Std. beginnt sie sich leicht zu trüben. Ein bläulicher Rand entwickelt sich erst nach vielen Tagen und zwar nur in ganz geringen Maasse. Bevor nun die Meerschweinchen gespritzt wurden, wurde von der Bouillon auf Gelatine übergeimpft und von derselben Platten gegossen.

Platte von Bouillon A. zeigte nach 72 Std. fast keine Entwicklung. Ich zählte mit der Lupe 16 Colonien; nach 96 Stunden fand ich 28 Colonien.

Platte von Bouillon B. zeigte nach 72 Stunden zahlreiche nicht zählbare Colonien.

Platte von C. zeigte sich nach 72 Stunden vollkommen mit Colonien übersät. Hier hatte entschieden die stärkste Entwicklung stattgefunden. Nach Schätzung übertraf die Zahl der Colonien die der Platte B. mindestens um das 3fache. Es handelte sich überall um Reinculturen.

Ein Vergleich der 3 Kölbchen während der Zersetzung zeigte, dass die geringe Zahl der Colonien auf der Platte A. nicht von einer geringeren Entwicklung in der Bouillon A. resultirte, sondern es hatten sich hier offenbar unter dem Einfluss des Alkali mehr jener Producte gebildet, welche abtödtend auf die Bakterien wirkten. Immer wieder ein Beweis für den Einfluss des Alkali auf den Stoffwechsel der Mikroben.

Nachdem nun durch Giessen von Platten festgestellt war, dass die Culturen rein geblieben waren, wurde ein Meerschweinchen zur Probe, welche Dosis zur Erzielung einer starken Infection nöthig war, mit 4 ccm der Bouillon A. geimpft. Ich nahm zu diesem Probeversuch Bouillon A., weil ich glaubte, dass die für die Bakterien selbst toxischen Producte auch in gleicher Weise toxisch für die Thiere wären und Bouillon A., wie oben auseinandergesetzt ist, mehr dieser Producte enthielt als Bouillon B. u. C.

Versuch 1. Meerschweinchen 260 g erhält von Bouillon A. 4 ccm subcutan unter die Rückenhaut (3 ccm rechts, 1 ccm links.)

Nach 2 Std. ist es kurzathmig, nach 4 Std. reagirt es schwer mit auffallender Schwäche der hinteren Extremitäten auf Berührung, dabei streckt es die Glieder von sich und hat die Augen fest geschlossen. Nach 7 $\frac{1}{2}$ Stunden Tod unter den Erscheinungen der Dyspnoe.

Section. An der Injectionsstelle nichts Besonderes.

In der Bauchhöhle etwa 10 ccm gelbe, klare Flüssigkeit, daneben gallertige Massen. — Därme wenig gefüllt, einzelne Hämorrhagien im Dünndarm. — Milz rothbraun, um das 3fache vergrößert. — Leber makrosk. gelbe Punkte und Striche. — mikroskopisch kleinzellige Infiltration. — Herz prall gefüllt, namentlich die Vorhöfe. — Nieren hyperämisch. — Lungen etwas atelectatisch im Unterlappen, sonst normal. Es wurden Culturen angelegt, aus den gelben Strichen der Leber, des Peritoneums, des flüssigen Oedems und des Herzbluts. Steril war das Herzblut und die Leber. Die ödematöse Flüssigkeit zeigte keine Reincultur. Nur vom Peritoneum gelang es, *Bacterium coli* in Reincultur zu züchten, obwohl keine Peritonitis gefunden wurde. Offenbar konnte sie sich in so kurzer Zeit noch nicht ausbilden.

Es handelte sich klinisch und path.-anatomisch im grossen und ganzen um das gewöhnliche Bild der allgemeinen Infection und Intoxication. Der

letzteren muss des schnellen Todes wegen ein grösserer Einfluss eingeräumt werden.

Der schnelle Eintritt des Todes nach der Injection bei einem im grossen und ganzen für so wenig virulent gehaltenen Mikroben wie *Bact. coli* veranlasste mich, den Versuch zu wiederholen und zugleich Versuche mit Bouillon B. und C. anzustellen. Ich konnte jetzt allerdings nur noch die Toxicität der Bouillon feststellen, da ich nach Abimpfen von den Bouillonculturen dieselben mit 1 ccm Chloroform versetzt und so die Bakterien abgetödtet hatte. — Ich glaubte auch mit der Dosis etwas heruntergehen zu müssen, um nicht nach diesem Probeversuche eine zu starke Virulenz zu haben.

Versuch 2. Meerschweinchen 258 g mit Bouillon A., 2 Spritzen subcutan in den Rücken geimpft.

Nach $1\frac{1}{2}$ Stunde starke Dyspnoe. Nach 20 Stunden ist das Thier völlig munter. Darauf erhielt das Thier noch 2 Spritzen subcutan in die Bauchhöhle. Nach $\frac{1}{4}$ Std. sehr unruhig. Nach 3 Stunden starke Orthopnoe und Schwäche in den hinteren Extremitäten. Nach 6 Stunden etwas erholdt, nach 20 Stunden munter.

Versuch 3. Meerschweinchen 227 g mit 2 ccm der Bouillon B., subcutan in den Rücken gespritzt.

Nach $1\frac{1}{2}$ Stunde starke Dyspnoe. Nach 20 Std. völlig munter. Darauf bekommt es noch 2 Spritzen subcutan. Nach $\frac{1}{4}$ Std. ist es sehr unruhig, und hat starke Orthopnoe. Es macht vergebliche Versuche mit dem Kopf nach der injicirten Stelle zu kommen. Nach 2 Std. bekommt das Thier einen heftigen Schüttelfrost. Es bewegt schmerzhaft die hinteren Extremitäten und verzieht krampfhaft die Gesichtsmusculatur. Nach einer weiteren $\frac{1}{2}$ Std. Schüttelkrämpfe. Am nächsten Morgen hat sich das Thier erholdt. Nach 24 Std. völlig munter.

Versuch 4. Meerschweinchen 216 g, 2 ccm der Bouillon C subcutan in die Rückenhaut gespritzt.

Nach der Injection heftige Schmerzen, das Thier schreit mehrere Minuten, läuft dabei im Kreise herum. Dann wird es ruhiger, kauert sich unter heftiger Dyspnoe in einer Ecke zusammen; erholdt sich aber sehr schnell und ist schon nach 3 Std. vollkommen munter. Nach 20 Stunden wieder 2 Spritzen subcutan in den Rücken. Nach 2 Std. Schüttelfrost und schmerzhaftes Bewegen der hinteren Extremitäten und im Gesicht. Nach 3 Stunden Schüttelkrämpfe. Am nächsten Morgen ist es munter.

Es waren alle 3 Thiere erkrankt; vor der zweiten Injection nur schwach; nach der zweiten Injection etwas stärker, am wenigsten das Thier No. 2, am stärksten No. 3, das mit Bouillon B. (8 ccm Alkali) geimpft war.

Als Krankheitssymptom zeigten sich Dyspnoe und Krämpfe. Von einer durch die erste Injection erworbenen Immunität kann nach diesen Versuchen nicht die Rede sein, da nach der zweiten Injection bei der gleichen Dosis viel bedrohlichere Erscheinungen auftraten, als nach der ersten Injection.

Diese Versuche wurden mit einer etwas stärkeren Dosis an 3 schwereren Thieren wiederholt (No. 5—7). Jedes Thier erhielt auf einmal 4 ccm subcutan.

Versuch 5. Meerschweinchen 525 g mit Bouillon A. gespritzt. Nach 1 Std. völlig apathisch. Nach 2 Std. starke Dyspnoe. Nach 5 Std. etwas erholt. Nach 20 Std. ist es immer noch sehr krank, die Haare sind struppig und es zeigt eine auffallende Schwäche in den hinteren Extremitäten. Nach weiteren 24 Stunden ist es völlig munter.

Versuch 6. Meerschweinchen 492 g mit Bouillon B. gespritzt. Nach 1 Std. dyspnoisch und apathisch. Nach 2 Std. heftige Orthopnoe. Es bekommt Thränenfluss; nach $2\frac{1}{2}$ Std. sieht man Trismus, der etwa 3 Minuten währt. Nach 5 Std. etwas erholt, doch schwerer krank als Thier No. 5 und No. 7. Nach 24 Std. noch immer krank, doch hat es die Gefahr überstanden. Nach weiteren 24 Std. etwas munterer. Erst nach einigen Tagen völlig munter.

Versuch 7. Meerschweinchen 440 g mit Bouillon C. eingepf. Nach 1 Std. geringe Dyspnoe, nach $2\frac{1}{2}$ Std. starke Dyspnoe, nach 3 Std. heftige Krämpfe. Nach 5 Std. etwas erholt. Nach 20 Std. völlig munter.

Alle 3 Thiere waren stark erkrankt. Das Thier No. 6, welches mit der Bouillon B. (8 cem Alkali) geimpft war, entschieden am stärksten; No. 7 mit Bouillon C. (12 cem Alkali) am schwächsten.

Der Versuch 1 hatte offenbar ein Zufallsresultat, das sich schwer erklären lässt, gegeben. Und es ist sicher, dass ich bei diesen Versuchen weit unter der tödtlichen Dosis geblieben war. Ich dampfte in Folge dessen von der Bouillon je 200 cem auf dem Wasserbade auf 40 cem ein, filtrirte, verdünnte mit sterilisirtem Wasser auf 50 cem und spritzte die so concentrirte Bouillon, nachdem ich sie zuvor mit $\frac{1}{2}$ cem Chloroform versetzt hatte, in den folgenden Versuchen den Thieren ein. Ehe injicirt wurde, verdampfte ich das Chloroform durch 1 Minute langes Erhitzen.

Versuch 8. Meerschweinchen 245 g 3 Spritzen subcutan in der Bauchgegend (3 cem) von Bouillon A. um 3 Uhr Vormittags. Das Thier macht sofort einen schwer kranken Eindruck. Starke Dyspnoe, Haare sehr struppig. 11 Uhr mit halbgeschlossenen Augen sitzt es zusammengekauert da, unter heftiger Dyspnoe. 1,25 Uhr starke Krämpfe mit heftigen Schmerzáusserungen. 1,30 Uhr heftige Orthopnoe und Zuckungen im Gesicht. Das Thier lässt sich leicht in jede beliebige Stellung bringen. 2 Uhr unter Krümmungen und Windungen, wie von Schmerz gepeinigt, wird es sehr unruhig, läuft von einer Ecke zur andern, schliesslich kauert es sich in einer Ecke zusammen und bleibt so ruhig sitzen. Um $4\frac{1}{2}$ Uhr tritt Speichelfluss auf; das Thier sieht aus, als würde es jeden Augenblick verenden. Am nächsten Morgen dauert der Zustand fort: die früher beobachteten Symptome wiederholen sich, doch in immer abgeschwächerem Maasse. Auch am dritten Tage treten noch Krämpfe auf, dann erholt es sich allmählig. 6 Tage nach der Injection völlig munter.

Versuch 9. Thier von 210 g mit 3 cem (Spritzen) der Bouillon B. in der Bauchgegend subcutan gespritzt. Das Thier ist gleich schwer vergiftet. Es liegt auf der Seite wie gelähmt. Legt man es auf den Tisch, so bleibt es in jeder Lage liegen. Reflexe vorhanden, schreit auf Kneifen. Nach $\frac{1}{2}$ Std. Orthopnoe. Haare struppig. Die Augen sind halb geschlossen. Plötzlich bekommt es heftige Schüttelkrämpfe, namentlich in den hinteren Extremitäten. Diese Krämpfe wiederholen sich alle 2—3 Minuten und sind bei jeder Berührung auszulösen. Das Thier macht vergebliche Gehbewegungen. Die Orthopnoe wird immer stärker und die Krämpfe so heftig, dass das Thier mit dem Kopf gegen die Wand des Käfigs geschleudert wird. Auf Schlag gegen den Käfig reagirt es noch durch Ohrbewegungen. Die Augen sind fest geschlossen.

Die Pausen zwischen den Schüttelkrämpfen werden immer geringer, schliesslich erfolgt alle 20 Sekunden ein Krampf, bei dem das Thier hin und her geworfen wird. Die Extremitäten hält es dabei von sich gestreckt. Nach $\frac{1}{4}$ Stunden hören die Krämpfe auf; nur bei Berührung treten sie noch auf. Das Thier liegt apathisch da. Von Zeit zu Zeit sieht man noch einige Zuckungen, während deren das Thier laut schreit. Die hinteren Extremitäten scheinen gelähmt zu sein. Legt man das Thier auf die Seite, so kann es sich nicht mehr aufrichten. Dann treten Schleuderbewegungen in den hinteren Extremitäten auf. Fusssehnenreflexe links nicht mehr vorhanden; rechts sehr schwach. Nach einigen Minuten Tod; 5 Stunden nach erfolgter Injection.

Section. An der Injectionsstelle geringe, subcutane Hämorrhagie. Nach Eröffnung des Peritoneum in der Bauchhöhle 20—25 ccm ödematöse, gelbe, klare Flüssigkeit. Därme stark ausgedehnt; namentlich das Colon ascendens. Hyperämie der Niere. Herz prall gefüllt. Milz nicht vergrössert. Lungen intact.

Das Thier war also unter den Zeichen der allgemeinen Intoxication in kürzester Zeit zu Grunde gegangen.

Versuch 10. Meerschweinchen 215 g mit 3 ccm der Bouillon C., subcutan in die Bauchgegend gespritzt. Vormittags 10,55 Uhr. Sehr ruhig nach der Injection, zittert heftig. Erst sitzt es zusammengekauert in einer Ecke; plötzlich läuft es dann durch den Käfig, schnuppert an der Nahrung ohne etwas anzurühren. Allmähig bildet sich eine heftige Dxspnoe aus, welche bis $11\frac{1}{2}$ Uhr zur hochgradigen Orthopnoe sich gesteigert hat. Dabei hat es die Augen fest geschlossen und sitzt ruhig da, vollkommen struppig. Plötzlich beginnen heftige, wie tetanische Zuckungen. Legt man es auf den Rücken, so kann es von selbst nicht mehr in die natürliche Lage zurückgelangen. Um 12 Uhr wird es unruhig und läuft unter schmerzhaften Bewegungen herum. Dann bekommt es wieder starke Krämpfe, dabei sind die hinteren Extremitäten gelähmt, so dass es sich nicht mehr fortbewegen kann. Um $1\frac{1}{2}$ 5 Uhr scheint es munterer zu sein. Am nächsten Morgen um 7 Uhr wird es todt im Käfig gefunden.

Section. Geringe Hämorrhagie an der Injectionsstelle, gallertiges Oedem in der Bauchhöhle. Nieren und Nebennieren intact. Milz normal. Lungen im Unterlappen etwas atelektatisch. Herz prall gefüllt.

Diese 3 letzten Versuche 8—10 ergaben in allen 3 Fällen eine sehr schwere Intoxication. Es handelte sich ja auch um eine sehr hohe Dosis, die injicirt wurde.

Das Thier No. 9, welches mit Bouillon B. (8 ccm Alkali) geimpft war, erkrankte am heftigsten. Es trat der Tod bereits nach 5 Stunden ein, während No. 10 (12 ccm Alkali) nach etwa 20 Stunden einging. Die Erkrankung des Thieres No. 8 (2 ccm Alkali) war auch sehr heftig. Dass es schliesslich mit dem Leben davankam, hat es vielleicht seinem etwas höheren Gewicht zu verdanken.

An Symptomen sind hervorzuheben bei allen Orthopnoe, Unruhe, Schwäche der hinteren Extremitäten, Krämpfe. Bei Thier No. 8 Speichelfluss, No. 9 das Vorwiegen der Schüttelkrämpfe. Die Section ergab nichts Besonderes.

Ich wollte nun diese Versuche, welche zu einem positiven Resultate zu führen schienen, wiederholen. Es standen mir aber nur Thiere von erheblich schwererem Gewicht zur Verfügung. Deshalb wandte ich die doppelte Dosis zur Injection an, also 6 ccm.

Versuch 11. Meerschweinchen 493 g je 3 Spritzen (3 ccm) rechts, und links subcutan in die Bauchgegend von Bouillon B. Nach wenigen Minuten ist es völlig struppig. Stark dyspnoisch liegt es ausgestreckt da. Dann treten starke Convulsionen des ganzen Körpers auf. Plötzlich legt es sich auf die Seite und bleibt so in eigenthümlicher Stellung mehrere Minuten liegen. Dann fängt es an mit halbgeschlossenen Augen den Hinterkörper hin und her zu wälzen. Die Convulsionen werden immer stärker, nach einer halben Stunde tritt heftige Orthopnoe auf. Krampfartig werden die hinteren Extremitäten angezogen und abgestossen. Nach $1\frac{1}{2}$ Std. sind die Augen fest geschlossen. Dabei sind jetzt die Krämpfe in den hinteren Extremitäten so stark, dass dabei das Thier mit den Füßen gegen den Boden geschleudert wird. Nach einer weiteren halben Stunde starke, wie tetanische Zuckungen im Unterkiefer. Am nächsten Morgen, also nach 20 Stunden scheint der Zustand ein wenig besser, doch ist es immer noch sehr schwer krank. Noch völlig struppig sitzt es zusammengekauert da mit halbgeschlossenen Augen, von heftiger Dyspnoe gequält. Nachmittags wird es sehr unruhig, es treten wieder heftige Convulsionen auf. Die Orthopnoe erreicht einen sehr hohen Grad, das Thier erscheint moribund. Am nächsten Morgen (48 Stunden nach der Injection) hat es sich etwas erholt. An der Injectionsstelle zeigt sich trockne Gangrän. Allmählig erholt sich das Thier nach Abstossung der gangränösen Stelle.

Versuch 12. Meerschweinchen 467 g, 3 Spritzen rechts, 3 links subcutan in die Bauchgegend von Bouillon C. Wenige Minuten nach der Injection auf den Tisch gelegt, bleibt es regungslos liegen; Fusssohlenreflexe erst nach stärkerer Einwirkung deutlich. Bald darauf bekommt es Thränenfluss. Dann kauert es sich in einer Ecke zusammen und bleibt dyspnoisch so stundenlang wie im Coma ruhig sitzen, ohne auf Stoss und Schlag lebhafter zu reagiren. Nach 24 Stunden hat es sich etwas erholt, nach 48 Stunden ziemlich munter. Gleichfalls Gangrän an der Injectionsstelle, die ebenfalls ohne weiteren Schaden für das Thier sich verliert.

Versuch 13. Meerschweinchen 540 g, je 3 Spritzen rechts und links in der Bauchgegend subcutan von Bouillon A. Das Thier sitzt völlig apathisch da, Convulsionen und Zittern. Im grossen und ganzen bietet das Thier dieselben Erscheinungen wie die Thiere No. 11 und 12, nur in weit geringerem Maasse. Nach drei Tagen zeigt sich trockne Gangrän an der Injectionsstelle, die gleichfalls ohne weitere Nachtheile für das Thier bleibt.

Das Thier No. 13 (2 ccm Alkali) war am schwächsten, No. 11 (8 ccm Alkali) und 12 (12 ccm Alkali) waren viel schwerer erkrankt. Da mir noch eine 8 Wochen alte Peptonlösung (2 g Pepton, 250 Wasser, 8 ccm Alkali), die mit 1 Platinöse von Bact.-coli-Gelatine-Reincultur geimpft war, zur Verfügung stand, so injicirte ich einem Meerschweinchen von 210 g davon 3 Spritzen subcutan in den Rücken.

Versuch 14. Das Thier zeigt dieselben Symptome, wie die mit Bouillon geimpften Thiere. Zuckungen, Frost, Apathie und Krämpfe; die hinteren Extremitäten scheinen wie gelähmt. Das Thier erholt sich anscheinend bald. Nach 18 Tagen plötzlich Exitus, nachdem das Thier zuvor immer munter gewesen war.

Section. Nieren hyperämisch, besonders die Marksubstanz, Herz prall gefüllt. Alle andern Organe intact. An der Injectionsstelle nichts Besonderes.

In diesen Versuchen zeigt sich, dass fast alle mit Bouillon B. (8 ccm Alkali) gespritzten Thiere schwerere Erscheinungen hatten, als die mit Bouillon A. oder C. gespritzten Thiere.

Trotzdem wage ich es nicht, daraus mit Sicherheit den Schluss zu ziehen, dass die Bouillon B. toxischer als Bouillon C. und namentlich als A. gewesen ist. Dazu sind die Thierversuche noch lange nicht zahlreich genug; dazu mussten mit der Bouillon viel zu viel Manipulationen¹⁾ vorgenommen werden, ehe sie sich sicher wirksam zeigte. Diese Versuche sind aber als Orientirung für weitere Untersuchungen brauchbar und zeigen, mit welchen Dosen im Verhältniss zum Gewicht der Thiere ungefähr bei *Bacterium coli* gearbeitet werden muss, um die Frage von dem Einfluss des Alkalis auf die Toxinbildung zu beantworten. Aus äusseren Gründen bin ich leider nicht in der Lage jetzt diese Versuche fortzusetzen, glaubte aber dieselben bereits mittheilen zu können, weil sie erstens eine grosse Wahrscheinlichkeit zeigen für den Einfluss des Alkalis auf die Toxinbildung und zweitens einen Beitrag liefern zu der Pathogenität des *Bact. coli*, die immer noch angezweifelt wird. Ähnliche oder dieselben Krankheitssymptome nach Injection der Toxine von *Bacter. coli* bei Fröschen fand Roger.²⁾ Bei der Infection von Thieren mit *Bact. coli* fanden Escherich,³⁾ Laruelle,⁴⁾ Alex. Fränkel⁵⁾ und Andere eine starke Pathogenität.

Ueber die Gerinnbarkeit der Milch durch *Bacter. coli* zum Unterschied von *Typhusbac.* kann ich auch noch einige Versuche mittheilen, aus denen hervorgeht, dass die Gerinnung der Milch nach Impfung mit diesen Bakterien auch vom Alkalescenzgrad derselben abhängig ist. Ueber die mit *Bacterium coli* infectirte Milch siehe oben S. 21. Bei Impfung mit *Typhusbacillen* beobachteten keine Gerinnung der Milch u. a. Blachstein⁶⁾ und Ury.⁷⁾ Ich fand, dass 500 cem neutraler, sterilisirter Milch, welche mit einer Reincultur von *Typhusbacillen* beschickt war, schon nach 8 Tagen; 500 cem Milch, die mit 4 cem 10 proc. Sodälösung versetzt war, etwa nach 3 Wochen und Milch (500 cem) die mit 6 cem Alkali versetzt war, nach etwa 4 Wochen zu coaguliren begann. Die Art der Coagulation ist allerdings beim *Typhusbacillus* eine andere als beim *Bacter. coli*. Auch fand ich selbst nach Monaten noch auf der Typhusmilch unabhängig vom Alkaligehalt eine dicke, speckige Haut, die oben auf dem Serum schwamm, was nie bei *Bact. coli* beobachtet wurde.

1) Eindampfen auf dem Wasserbade, filtriren.

2) La semaine médicale. 1893. No. 29.

3) Fortschritte der Medicin. 1885. S. 521.

4) Baumgarten, Jahresbericht. 1889. S. 335.

5) Wiener klin. Wochenschrift. 1891. No. 13—15.

6) Archiv des sciences biol., publ. par l'Institut imp. de méd. expér. à St. Pétersbourg. T. I. No. 1 u. 2.

7) Ury, Inaug.-Dissert. Strassburg 1894.

Betrachtet man die Ergebnisse aller Versuche, welche angestellt waren, den Einfluss des Alkali auf die Lebensthätigkeit der Mikroben festzustellen, so zeigt sich

1. Bei Mischculturen sowohl, als auch bei Reinculturen ist die Bildung der einzelnen chemisch nachweisbaren Stoffwechselproducte abhängig vom Alkaligehalt des Zersetzungsmaterials; dabei ist die Intensität der Zersetzung entweder gar nicht oder nur wenig vom Alkalizusatz abhängig.

2. Die Verflüssigung der Gelatine ist abhängig vom Alkaligehalt derselben.

3. Die Bildung der für die Bakterien selbst schädlichen Producte ist abhängig von dem Alkalescentzgrad der Culturen.

4. Mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit kann auch angenommen werden, dass die Toxinbildung der Mikroben unter dem Einfluss des Alkali steht.

Zum Schluss ist es mir eine ehrenvolle Pflicht meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor E. Salkowski, für die mir auch bei dieser Arbeit freundlichst gewährte Unterstützung meinen herzlichsten Dank auszusprechen.



16850

