Ueber Stoffwechselproducte von Mikroorganismen.¹

II. Mittheilung.

Von

Prof. E. von Sommaruga
in Wien.

Im vorigen Jahre habe ich² über Versuche berichtet, aus denen sich ergab, dass eine grössere Zahl von Bakterienarten unsere gewöhnlichen Arten von Nährböden, nämlich Bouillon, Gelatine und Agar, derart ausnützt, bezw. dieselben so zersetzt, dass nach längerem Wachstume eine Erhöhung der zu Anfang der Versuche festgestellten Alkalescentz, somit die überwiegende Bildung von alkalischen Stoffwechselproducten nachweisbar war.

Im Nachstehenden will ich über ähnliche Versuche berichten, bei denen dieselben Nährböden, jedoch unter Zusatz von Glycerin, benutzt wurden. Die Ueberlegung, von der ich ausging, war einfach folgende. Bekanntlich ist die Cultur gewisser Bakterienarten an das Vorhandensein von Glycerin im todten Nährsubstrate entweder direct geknüpft, wie dies von Nocard und Roux³ für die Tuberculose-Bacillen zuerst nachgewiesen und unter Anderen von Hammerschlag⁴ und Sander⁵ bestätigt wurde, oder es wachsen besonders manche pathogene Arten auf glycerinhaltigen Substraten relativ viel besser, wie Krautfeld⁶ für die Rotz-Bacillen, Kitasato⁷ für die Diphtherie-Bacillen gefunden haben;

¹ Eingegangen am 28. Juli 1893.

² *Diese Zeitschrift.* Bd. XII. S. 273.

³ *Ann. Inst. Pasteur.* T. I. p. 19: das Glycerin sollte nur das Austrocknen von Agar bei langem Verweilen im Brutschranke verhindern, der Erfolg der gelungenen Züchtung war somit ein zufälliger.

⁴ *Centralblatt für klinische Medicin.* 1891. Nr. 1.

⁵ *Archiv für Hygiene.* Bd. XVI. Hft. 3.

⁶ *Centralblatt für Bakteriologie.* Bd. II. S. 273.

⁷ *Ebenda.* Bd. II. S. 105 in der Fussnote.

den noch etwas zweifelhaften Beweis für die Cultivirbarkeit von Lepra-Bacillen auf Glycerin-Agar, den Bordoni-Uffreduzzi¹ und Gianturco² erbracht haben wollen, will ich nur nebenher erwähnt haben. In welcher Weise das Glycerin von den genannten Bakterienarten ausgenützt wird, ist bisher nicht untersucht worden; Nocard und Roux bemerken dies in ihrer Arbeit ausdrücklich, geben jedoch gleichzeitig an, dass die alkalische Reaction des von ihnen benutzten Glycerin-Agar durch das Wachsthum der Tuberkel-Bacillen nicht geändert wird. Ob sie das nur qualitativ feststellten, ist nicht gesagt; wohl aber aus dem Sinne der betreffenden Stelle zu entnehmen. Ist die saprophytische Existenz von pathogenen Mikroorganismen an den Umstand geknüpft, dass ihnen Glycerin als Nährstoff zur Verfügung steht, so fragt es sich, woher dieselben das Glycerin nehmen können. Pflanzliche und thierische Glyceride stehen offenbar nahezu auf jedem todtten Nährsubstrate zur Verfügung und es kann sich nur darum handeln, ob Bakterien die Fette durch Hydrolyse zu spalten vermögen und sich dadurch das Glycerin zugänglich machen können. Ueber Spaltung von Glyceriden durch Bakterien habe ich in der Litteratur nur sehr wenige Angaben finden können. Flüge³ führt dieselbe auf die Wirkung eines dem Pancreassecrete ähnlichen Fermentes zurück und ist ein solches nach ihm „vermuthlich auch in manchen Pflanzen und niederen Pilzen enthalten.“ Wenn man bedenkt, dass auch ohne Fermentwirkung durch rein chemische Agentien wie Wasser in höherer Temperatur und bei höherem Drucke, durch Alkalien und ebenfalls durch Säuren die Spaltung der Fette leicht gelingt, somit eine viel geringere chemische Arbeitsleistung erfordert als die Spaltung der Eiweisskörper, so wird man in der That nicht zweifeln können, dass Mikroorganismen, Fette zu spalten und damit auch das Glycerin derselben als Nährstoff auszunutzen, im Stande sind. Gerade das so einfach constituirte Glycerin mit seinem aus drei Atomen Kohlenstoff bestehenden Molekül erfüllt überdies eine von Nägeli wahrscheinlich gemachte Bedingung, dass das erste Assimilationsproduct niedriger Organismen aus einem aus drei Atomen Kohlenstoff gebildeten Complexe aufgebaut ist, vollständig. Versuche, Bakterien auf Fette enthaltenden Nährböden zu cultiviren, liegen meines Wissens überhaupt nicht vor; wohl aber könnte von Gottstein⁴ das rasche Absterben von *Bac. fluorescens putridus*, einer unreinen Spaltpilzcultur aus der Mundhöhle und von

¹ *Diese Zeitschrift*. 1887. Ref. in *Centralblatt f. Bakteriologie*. Bd. II. S. 300.

² *Centralblatt für Bakteriologie*. Bd. VI. S. 702.

³ *Mikroorganismen*. 2. Aufl. S. 466 u. 471.

⁴ *Berliner klinische Wochenschrift*. 1887. Nr. 48.

Penicillium glaucum in reinem Lanolin und Schmalz und von Manfredi¹ das Sterilbleiben von mit Milzbrand geimpften Nährböden mit 66 Proc. Fettgehalt, das Kümern solcher Culturen bei einem Gehalte von 33 bis 50 Proc. Fett nachgewiesen werden. Bei diesen Ergebnissen ist jedoch wohl zu berücksichtigen, dass zwischen so enorm grossen Mengen von Fetten in den benutzten Nährböden und denjenigen, die sich in pflanzlichen und thierischen, todtten Nährsubstraten finden, ein sehr bedeutender Unterschied besteht. Ich will in dieser Richtung nur auf eine Beobachtung von Schmidt² hinweisen, der *Bacterium coli* auf butterhaltiger Gelatine und ebensolchem Agar unter Erscheinungen der Polymorphie wachsen sah, wie sich eine solche nur im Darms des Kindes nachweisen liess, woraus sich der augenscheinliche Einfluss des fetthaltigen Nährbodens direct ergab. Wenn also auch für den Augenblick Beweise für die Bedeutung von Fetten für das Wachsthum von Mikroorganismen in allgemeinerer Weise noch ausstehen und in dieser Richtung Versuche sowohl mit pflanzlichen wie thierischen Fetten noch unbedingt erforderlich sind, so haben doch meine Versuche über die Ausnützung des Glycerins als Nährsubstanz so überraschende Ergebnisse geliefert, dass ich deren Veröffentlichung schon jetzt für angezeigt halte.³

Zu meinem Versuche benutzte ich die herkömmlichen Nährböden und zwar Bouillon aus 1 Kilo Fleisch mit 1 Liter Wasser, 10^{gramm} Pepton und 5^{gramm} Kochsalz bereitet, Gelatine aus solcher Bouillon mit 10 Proc. Gelatine-, Agar mit 1½ Proc. Agar-Zusatz; den fertigen Nährböden wurden stets 5 Proc. Glycerin zugesetzt. Da mir bezüglich der verwendeten Materialien gelegentlich Bedenken gekommen waren, so habe ich zwei Arten Pepton, nämlich das gewöhnliche Peptonum siccum purum des Handels aus mir nicht bekannter Quelle stammend, und das reinste Pepton von Witte (alcoh. dep.), sowie zwei Sorten Glycerin und zwar reinstes käufliches, gleichfalls von nicht feststellbarer Provenienz und krystallisirtes Glycerin von Hrn. Sarg⁴ benutzt. Wie sich aus den später folgenden Zahlen ergibt, haben sich jedoch aus der Verwendung dieser verschiedenen Präparate so gut wie keine Unterschiede ableiten lassen.

¹ *Rendic. Acc. Lincei.* Bd. III. Fasc. 12.

² *Wiener klinische Wochenschrift.* 1892. Nr. 45.

³ Da ich nur unter grossen Schwierigkeiten und mit nach jeder Richtung unvollkommenen Hilfsmitteln zu arbeiten in der Lage bin, so nehmen meine Arbeiten nicht den von mir gewünschten rascheren Fortgang.

⁴ Dieses von der Firma F. A. Sarg's Sohn & Co., Milly-Kerzen-, Seifen- und Glycerin-Fabrik in Liesing bei Wien, allein fabricirte Präparat wird nur ausnahmsweise abgegeben; war mir aber durch die Liebenswürdigkeit des Hrn. Sarg zur Verfügung gestellt worden.

Bezüglich der von mir benutzten Stammculturen bemerke ich, dass sie die Tochterculturen derjenigen waren, die ich im Vorjahre verwendet und in einer entsprechenden Zahl von Uebertragungen fortgezüchtet habe; zu jedem Versuche wurden die Stammculturen auf gewöhnliches Agar von einer und derselben Bereitung überimpft und die so gewonnenen neuen Culturen nach ca. 8 Tage dauerndem Wachsthum für die quantitativen Versuche benutzt; es waren somit Culturen, die stets unter ganz gleichen Verhältnissen gezogen waren. Jeder Versuch wurde doppelt ausgeführt, die Gelatine- und Agar-Culturen im Striche angelegt, und von jedem Culturglase wurden nach stets gleich langer Zeit (35 Tagen) mindestens zwei Bestimmungen gemacht, so dass jede Zahl der folgenden Tabellen den Durchschnitt von vier Bestimmungen darstellt. Dass ich mich vor der Titration des Inhaltes der Culturgläser stets davon überzeuge, ob die Culturen rein und lebend oder abgestorben waren, brauche ich wohl kaum zu erwähnen; das ist wohl selbstverständlich. Zum Ueberimpfen in Glycerin-Bouillon bediente ich mich stets einer und derselben, recht kleinen Platindrahtöse, zum impfen auf Glycerin-Gelatine und Agar stets derselben Platinnadel, und trachtete ich stets, thunlichst gleich viel Material zur Aussaat zu bringen. Trotz dieser Vorsicht ist es von vornherein gar nicht anders zu erwarten, als dass in den Einzelversuchen sehr ungleiche Mengen von lebensfähigen Keimen zur Aussaat kamen, und es ist geradezu merkwürdig, dass trotz der Unvollkommenheit des Impfmodus zwischen den Zahlen für je zwei, mit derselben Art geimpften Röhrenchen nur ausnahmsweise grössere Differenzen vorkamen; oft bedurften die beiden Röhrenchen à 10^{cem} Inhalt zur Herstellung der neutralen Reaction thatsächlich ganz gleicher Mengen von $\frac{1}{10}$ Normal-Titrefflüssigkeit, oder die Verbrauchsmengen differirten nur um einige Zehntel-Cubikcentimeter derselben, so dass derartige Unterschiede nur auf die ungleiche Menge des überimpften Materiales zurückzuführen waren. Unter gleichen Bedingungen waren die Mengen der gebildeten Stoffwechselproducte auch wirklich gleich gross. Das in meiner ersten Mittheilung näher mitgetheilte Verfahren, mit wässriger Rosolsäurelösung als Indicator auf schwach alkalische Reaction zu titriren, hat sich bestens bewährt und konnten selbst sehr subtile Unterschiede im Verbräuche an Titrefflüssigkeit noch mit grosser Schärfe erkannt werden.

Ich lasse die Ergebnisse meiner Versuche nachstehend in einer Anzahl von Tabellen folgen, in denen ich jedoch den Zustand der Culturen zur Zeit der Beendigung der Versuche etwas ausführlicher erwähnen muss, als ich dies in meiner ersten Mittheilung thun konnte. Deshalb ist auch aus räumlichen Gründen die Nebeneinanderstellung der je drei Reihen für jede Art von Nährböden nicht thunlich.

Versuche in Glycerin-Bouillon.

I. Controle brauchte vor der Impfung 0.69^{cem} $\frac{1}{10}$ Normal-H₂SO₄, nach 35 Tagen 0.71^{cem} H₂SO₄; sonach Gehalt der Glycerin-Bouillon an NaOH = 0.0284 Procent; verwendet wurden gewöhnliches Pepton und ebensolches Glycerin.

	Zustand der Cultur zu Ende des Versuches.	Verbrauch für 10 ^{cem}
Sp. Cholera	Reichlich gewachsen, starkes Häutchen, darin vorzüglich färbbare und ebenso bewegliche Spir.; keine Fäden.	2.11 NaOH
Sp. Finkler-Prior	Mässig gewachsen, Bouillon fast ganz klar; Cultur nahezu ganz abgestorben.	2.34 „
B. Metschnikoff	Reichlich gewachsen, sehr starkes Häutchen, vorzüglich färbbare und ebenso bewegliche Bacillen.	0.94 „
B. Emmerich	Reichlich gewachsen, noch gut färbbare, lebende Bac.	2.27 „
B. Typhus	Reichlich gewachsen, vorzüglich färbbare und ebenso bewegliche Bacillen.	1.49 „
B. Brieger	Ziemlich gut gewachsen, noch sehr gut färbbare lebende Bacillen.	2.69 „
B. Ribbert	Reichlich gewachsen, noch gut färbbare, lebende Bac.; keine Fäden.	2.87 „
B. Milzbrand	Recht mässig gewachsen, noch lebende, Sporen enthaltende Bacillen.	0.66 „
B. Friedländer	Reichlich gewachsen, unter viel Detritus noch gut färbbare, lebende Bacillen.	2.20 „
B. pyocyaneus	Sehr reichlich gewachsen, vorzüglich färbbare und ebenso bewegliche Bacillen.	0.54 H ₂ SO ₄
B. capsul. Pfeiffer	Gut gewachsen, noch gut färbbare, lebende Bacillen.	3.07 NaOH
M. tetragenus	Gut gewachsen, gut färbbare, in Theilung begriffene Meristen.	1.19 „
Sp. Denecke	Reichlich gewachsen, im dicken Häutchen gut färbbare, ebenso bewegliche Spirillen.	1.32 „
B. subtilis	Sehr reichlich gewachsen, im dicken Häutchen noch gut färbbare Bac., die kürzeren auch noch gut bewegl.	0.72 „
B. wurzelförmig.	Reichlich gewachsen, im dicken Häutchen gut färbbare, mässig bewegliche Bacillen.	0.65 „
B. megaterium	Mässig gewachsen, gut färbbare und ebenso bewegliche, typische Bacillen.	0.56 „
B. Trommelschl.	Mässig gewachsen, noch gut färbbare, lebende Bacillen.	0.99 H ₂ SO ₄
B. Milchsäure	Reichlich gewachsen, gut färbbare, lebende Bacillen.	2.94 NaOH
Weisse Hefe	Mässig gewachsen, noch lebende, in Sprossung begriffene Hefe.	0.37 H ₂ SO ₄

II. Controle brauchte vor der Impfung 0.50 ccm $\frac{1}{10}$ Normal- H_2SO_4 , nach 35 Tagen 0.30 ccm H_2SO_4 ; sonach Gehalt der Glycerin-Bouillon an NaOH = 0.0120 Procent; verwendet wurden gewöhnliches Pepton und ebensolches Glycerin.

	Zustand der Cultur zu Ende des Versuches	Verbrauch für 10 ccm
Sp. Cholera	Reichlich gewachsen, im Häutchen neben viel Detritus noch gut färbbare und ebenso bewegliche Spirillen.	1.55 NaOH
Sp. Finkler-Prior	Nicht besonders gewachsen, kaum mehr lebende Spirillen.	1.80 „
B. Metschnikoff	Reichlich gewachsen, noch vorzüglich färbbare und ebenso bewegliche Bacillen.	0.20 „ 0.10 H_2SO_4
B. Emmerich	Reichlich gewachsen, vorzüglich färbbare, lebende Bacillen.	2.00 NaOH
B. Typhus	Reichlich gewachsen, noch gut färbbare, ebenso bewegliche Bacillen.	1.57 „
B. Brieger	Gut gewachsen, noch gut färbbare, lebende Bacillen.	2.05 „
B. Ribbert	Reichlich gewachsen, noch gut färbbare, auffallend kurze, lebende Bacillen.	2.67 „
B. Milzbrand	Gut gewachsen, noch gut färbbare, lebende Bacillen, mitunter lange Fäden.	1.15 „
B. Friedländer	Gut gewachsen, noch gut färbbare lebende Bacillen.	2.65 „
B. pyocyaneus	Reichlich gewachsen, vorzüglich färbbare, ebenso bewegliche Bacillen, reichliche Farbstoffproduction.	1.60 H_2SO_4
B. capsul. Pfeiffer	Reichlich gewachsen, noch gut färbbare, lebende Bac.	2.02 NaOH
M. tetragenus	Mässig gewachsen, noch sehr gut färbbare, in Theilung begriffene Meristen.	0.80 „
Sp. Denecke	Reichlich gewachsen, im dicken Häutchen vorzüglich färbbare, ebenso bewegliche Spirillen.	0.39 „
B. subtilis	Reichlich gewachsen, im dicken Häutchen vorzüglich färbbare, gut bewegliche Bacillen.	1.60 „
B. wurzelförmig.	Reichlich gewachsen, im dicken Häutchen noch gut färbbare, mässig bewegliche Bacillen.	0.95 „
B. megaterium	Gut gewachsen, noch gut färbbare, sehr schwach bewegliche Bacillen.	1.15 „
B. Trommelschl.	Mässig gewachsen, noch gut färbbare, lebende Bacillen.	0.60 H_2SO_4
B. Milchsäure	Mässig gewachsen, noch gut färbbare, lebende Bacillen.	1.80 NaOH
Weisse Hefe.	Mässig gewachsen, noch gut färbbare, in Sprossung begriffene Hefe.	0.18 H_2SO_4

III. Controle brauchte vor der Impfung 0.18^{ccm} $\frac{1}{10}$ Normal- H_2SO_4 , nach 35 Tagen 0.25^{ccm} H_2SO_4 ; sonach der Gehalt der Glycerin-Bouillon an NaOH = 0.0100 Procent; verwendet wurden reinstes Pepton von Witte und krystallisirtes Glycerin von Sarg.

	Zustand der Cultur zu Ende des Versuches	Verbrauch für 10 ^{ccm}
Sp. Cholera	Gut gewachsen, im Häutchen vorzüglich färbbare und ebenso bewegliche Spirillen, keine Fäden.	1.25 NaOH
Sp. Finkler-Prior	Mässig gewachsen, Cultur abgestorben.	1.57 „
B. Metschnikoff	Reichlich gewachsen, noch sehr gut färbbare, ebenso bewegliche Bacillen.	1.07 „
B. Emmerich	Gut gewachsen, noch vorzüglich färbbare lebende Bacillen.	2.05 „
B. Typhus	Mässig gewachsen, nur noch wenige gut färbbare, mässig bewegliche Bacillen.	1.65 „
B. Brieger	Reichlich gewachsen, im Häutchen noch gut färbbare, lebende Bacillen.	2.17 „
B. Ribbert	Reichlich gewachsen, neben viel Detritus noch gut färbbare, lebende Bacillen.	3.10 „
B. Friedländer	Reichlich gewachsen, noch gut färbbare, lebende Bac.	1.57 „
B. Milzbrand	Mässig gewachsen, noch gut färbbare, sporentragende Bacillen.	0.90 „
B. pyocyaneus	Sehr reichlich gewachsen, vorzüglich färbbare, ebenso bewegliche Bacillen, reichliche Farbstoffproduction.	1.50 H_2SO_4
B. capsul. Pfeiffer	Reichlich gewachsen, noch gut färbbare, lebende Bacillen.	2.27 NaOH
M. tetragenus	Gut gewachsen, noch gut färbbare, in Theilung begriffene Meristen.	0.75 „
Sp. Denecke	Reichlich gewachsen, im starken Häutchen vorzüglich färbbare, ebenso bewegliche Spirillen.	0.90 „
B. subtilis	Reichlich gewachsen, im dicken Häutchen kaum mehr lebende, unbewegl., sporentragende Bac. und Fäden.	1.65 „
B. wurzelförmig.	Reichlich gewachsen, im dicken Häutchen gut färbbare, kaum bewegliche, sporulirende Bacillen.	1.05 „
B. megaterium	Reichlich gewachsen, noch gut färbbare, mässig bewegliche, typische Bacillen.	0.80 „
B. Trommelschl.	Gut gewachsen, noch gut färbbare, lebende Bacillen.	0.80 H_2SO_4
B. Milchsäure.	Reichlich gewachsen, noch sehr gut färbbare, lebende Bacillen.	1.85 NaOH
Weisse Hefe	Gut gewachsen, noch gut färbbare, in Sprossung begriffene Hefe.	0.05 H_2SO_4

Versuche in Glycerin-Gelatine.

I. Controle brauchte vor der Impfung 0.33^{cem} $\frac{1}{10}$ Normal- H_2SO_4 , nach 35 Tagen 0.43^{cem} H_2SO_4 ; sonach Gehalt der Glycerin-Gelatine an NaOH = 0.0172 Procent; verwendet wurden gewöhnliches Pepton und eben- solches Glycerin.

	Zustand der Cultur zu Ende des Versuches	Verbrauch für 10 ^{cem}
Sp. Cholera	Mässig gewachsen, Gelatine ganz flüssig, noch gut färb- bare, ebenso bewegliche Spirillen.	1.51 NaOH
Sp. Finkler-Prior	Reichlich gewachsen, Gelatine ganz flüssig, noch gut färbbare, ebenso bewegliche Spirillen.	2.08 „
B. Metschnikoff	Reichlich gewachsen, Gelatine ganz flüssig, noch gut färbbare, ebenso bewegliche Bacillen.	0.93 „
B. Emmerich	Gut gewachsen, noch gut färbbare, lebende Bacillen.	6.01 „
B. Typhus	Mässig gewachsen, unter viel Detritus noch gut färb- bare, bewegliche Bacillen.	3.08 „
B. Brieger	Gut gewachsen, noch lebende, gut färbbare Bacillen.	2.94 „
B. Ribbert	Gut gewachsen, noch gut färbbare, lebende Bacillen.	4.53 „
B. Milzbrand	Reichlich gewachsen, Gelatine ganz flüssig, unter viel Detritus noch gut färbbare, lebende Bacillen.	1.36 „
B. Friedländer	Reichlich gewachsen, noch gut färbbare, lebende Ba- cillen.	1.58 „
B. pyocyaneus	Reichlich gewachsen, Gelatine ganz flüssig, vorzüglich färbbare, ebenso bewegliche Bacillen; reichliche Farb- stoffproduction.	2.52 H_2SO_4
B. capsul. Pfeiffer	Reichlich gewachsen, noch gut färbbare, lebende Ba- cillen.	3.35 NaOH
M. tetragenus	Recht gut gewachsen, noch gut färbbare, in Theilung begriffene Meristen.	4.11 „
Sp. Denecke	Reichlich gewachsen, Gelatine ganz flüssig, noch gut färbbare, vorzüglich bewegliche Spirillen.	0.43 „
B. subtilis	Reichlich gewachsen, Gelatine ganz flüssig, gut färb- bare, mässig bewegliche, sporulirende Bacillen.	1.83 „
B. wurzelförmig.	Reichlich gewachsen, Gelatine ganz flüssig, noch gut färbbare, mässig bewegliche, sporulirende Bacillen.	1.93 „
B. megaterium	Mässig gewachsen, Gelatine ganz flüssig, noch gut färbbare, mässig bewegliche, typische Bacillen.	0.75 „
B. Trommelschl.	Mässig gewachsen, noch gut färbbare, lebende Ba- cillen.	0.10 H_2SO_4
B. Milchsäure	Reichlich gewachsen, noch gut färbbare, lebende Ba- cillen.	5.44 NaOH
Weisse Hefe	Ueppig gewachsen, noch lebende, in Sprossung be- griffene Hefe.	0.49 H_2SO_4

II. Controle brauchte vor der Impfung 0.28 ^{cem} · ¹/₁₀ Normal-H₂SO₄, nach 35 Tagen 0.25 ^{cem} H₂SO₄; sonach Gehalt der Glycerin-Gelatine an NaOH = 0.0100 Procent; verwendet wurden gewöhnliches Pepton und ebensolches Glycerin.

	Zustand der Cultur zu Ende des Versuches	Verbrauch für 10 ^{cem}
Sp. Cholera	Mässig gewachsen, Gelatine nicht ganz flüssig, im Häutchen noch vorzügl. färbbare, ebenso bewegliche Spir.	1.38 NaOH
Sp. Finkler-Prior	Reichlich gewachsen, Gelatine ganz flüssig, noch einige gut färbbare, schwach bewegliche Spirillen.	2.40 „
B. Metschnikoff	Reichlichst gewachsen, Gelatine ganz flüssig, neben viel Detritus gut färbbare, ebenso bewegliche Bacillen.	0.76 „
B. Emmerich	Reichlich gewachsen, unter viel Detritus noch vorzüglich färbbare, lebende Bacillen.	5.68 „
B. Typhus	Reichlich gewachsen, unter viel Detritus noch gut färbbare, ebenso bewegliche Bacillen.	4.84 „
B. Brieger	Reichlich gewachsen, noch gut färbbare, lebende Bac.	2.91 „
B. Ribbert	Reichlich gewachsen, noch gut färbbare, lebende Bac.	3.43 „
B. Milzbrand	Reichlich gewachsen, Gelatine ganz flüssig, im Häutchen vorzüglich färbbare, lebende Bacillen.	1.05 „
B. Friedländer	Reichlich gewachsen, noch sehr gut färbbare, lebende Bacillen.	1.52 „
B. pyocyaneus	Reichlich gewachsen, Gelatine ganz flüssig, vorzügl. färbbare, ebenso bewegl. Bac., reichl. Farbstoffproduction.	2.96 H ₂ SO ₄
B. capsul. Pfeiffer	Reichlich gewachsen, noch gut färbbare, lebende Bac.	neutral
M. tetragenus	Gut gewachsen, noch gut färbbare, in Theilung begriffene Meristen.	3.36 NaOH
Sp. Denecke	Reichlich gewachsen, Gelatine ganz flüssig, noch gut färbbare, ebenso bewegliche Spirillen.	1.36 „
B. subtilis	Reichlich gewachsen, Gelatine ganz flüssig, im Häutchen noch sehr gut färbbare, nur wenig bewegliche, lange Bacillen.	2.08 „
B. wurzelförmig.	Reichlich gewachsen, Gelatine ganz flüssig, noch gut färbbare, schwach bewegliche Bacillen.	1.58 „
B. megaterium	Reichlich gewachsen, Gelatine ganz flüssig, noch gut färbbare, fast nicht mehr bewegliche Bacillen.	0.46 „
B. Trommelsbhl.	Gut gewachsen, Gelatine auffallend bräunlich gefärbt, sehr gut färbbare, lebende Bacillen.	0.81 H ₂ SO ₄
B. Milchsäure	Reichlich gewachsen, noch vorzüglich färbbare, lebende Bacillen.	4.91 NaOH
Weisse Hefe	Reichlich gewachsen, noch lebende, sprossende Hefe.	0.09 H ₂ SO ₄

III. Controle brauchte vor der Impfung 0.21^{ccm} $\frac{1}{10}$ Normal- H_2SO_4 , nach 35 Tagen 0.15^{ccm} H_2SO_4 ; sonach Gehalt der Glycerin-Gelatine an $\text{NaOH} = 0.0060$ Procent; verwendet wurden reinstes Pepton von Witte und krystallisirtes Glycerin von Sarg.

	Zustand der Cultur zu Ende des Versuches.	Verbrauch für 10 ^{ccm}
Sp. Cholera	Mässig gewachsen, Gelatine ganz flüssig, nur wenige, noch gut färbbare, schwach bewegliche Spirillen.	0.92 NaOH
Sp. Finkler-Prior	Mässig gewachsen, Gelatine nur zum Theil flüssig, Cultur so gut wie abgestorben.	1.72 „
B. Metschnikoff	Gut gewachsen, Gelatine ganz flüssig, im Häutchen vorzüglich färbbare, ebenso bewegliche Bacillen.	0.05 „
B. Emmerich	Gut gewachsen, noch sehr gut färbbare, lebende Bacillen.	5.02 „
B. Typhus	Dürftig gewachsen, trotzdem noch gut färbbare, ziemlich bewegliche Bacillen.	1.80 „
B. Brieger	Reichlich gewachsen, noch gut färbbare, lebende Bacillen.	2.62 „
B. Ribbert	Ziemlich gut gewachsen, Cultur so gut wie abgestorben.	3.07 „
B. Milzbrand	Ziemlich gut gewachsen, Gelatine ganz flüssig, noch gut färbbare, lebende Bacillen.	1.32 „
B. Friedländer.	Gut gewachsen, noch vorzüglich färbbare, lebende Bacillen.	1.38 „
B. pyocyaneus	Reichlich gewachsen, Gelatine ganz flüssig, vorzüglich färbbare, ebenso bewegliche Bacillen, reichliche Farbstoffproduction.	2.60 H_2SO_4
B. capsul. Pfeiffer	Reichlich gewachsen, noch gut färbbare, lebende Bacillen.	2.77 NaOH
M. tetragenus	Mässig gewachsen, sehr gut färbbare, in Theilung begriffene Meristen.	3.30 „
Sp. Denecke	Reichlich gewachsen, Gelatine ganz flüssig, im Häutchen fast keine lebenden Spirillen mehr.	neutral
B. subtilis	Reichlich gewachsen, Gelatine ganz flüssig, nur wenige lebende und schwach bewegliche Bacillen.	1.88 NaOH
B. wurzelförmig.	Reichlich gewachsen, Gelatine ganz flüssig, in dicken Häutchen noch gut färbbare, mässig bewegliche Bacillen.	1.25 „
B. megaterium	Reichlich gewachsen, Gelatine ganz flüssig, noch sehr gut färbbare, typisch wacklig bewegliche Bacillen.	1.40 „
B. Trommelschl.	Gut gewachsen, Gelatine dunkelgelb gefärbt, noch gut färbbare, lebende Bacillen.	0.15 H_2SO_4
B. Milchsäure	Gut gewachsen, noch gut färbbare, lebende Bacillen.	3.35 NaOH
Weisse Hefe	Reichlich gewachsen, noch lebende, sprossende Hefe.	0.12 H_2SO_4

Versuche in Glycerin-Agar.

I. Controle brauchte vor der Impfung $0.10 \text{ ccm } \frac{1}{10}$ Normal- H_2SO_4 , nach 35 Tagen $0.13 \text{ ccm } \text{H}_2\text{SO}_4$; sonach Gehalt des Glycerin-Agar an NaOH = 0.0052 Procent; verwendet wurden gewöhnliches Pepton und eben- solches Glycerin.

	Zustand der Cultur zu Ende des Versuches.	Verbrauch für 10 ccm
Sp. Cholera	Reichlich gewachsen, vorzüglich färbbare, ebenso bewegliche Spirillen.	1.83 NaOH
Sp. Finkler-Prior	Dürrtig gewachsen, Cultur abgestorben.	1.85 ..
B. Metschnikoff	Reichlich gewachsen, vorzüglich färbbare, ebenso bewegliche Bacillen.	0.83 ..
B. Emmerich	Reichlich gewachsen, im Agar Gasblasen, vorzüglich färbbare, lebende Bacillen.	3.62 ..
B. Typhus	Reichlich gewachsen, vorzüglich färbbare, ebenso bewegliche Bacillen.	2.95 ..
B. Brieger	Reichlich gewachsen, im Agar Gasblasen, vorzüglich färbbare, lebende Bacillen.	3.15 ..
B. Ribbert	Reichlich gewachsen, noch sehr gut färbbare, lebende Bacillen.	3.58 ..
B. Milzbrand	Reichlich gewachsen, sehr gut färbbare, sporentragende Bacillen.	1.05 ..
B. Friedländer	Gut gewachsen, im Agar Gasblasen, noch gut färbbare, lebende Bacillen.	2.23 ..
B. pyocyaneus	Gut gewachsen, vorzüglich färbbare, ebenso bewegliche Bacillen, reichliche Farbstoffproduction.	0.40 H_2SO_4
B. capsul. Pfeiffer	Ueppig gewachsen, im Agar Gasblasen, noch vorzüglich färbbare, lebende Bacillen.	0.85 NaOH
M. tetragenus	Dürrtig gewachsen, noch gut färbbare, in Theilung begriffene Meristen.	1.04 ..
Sp. Denecke	Gut gewachsen, Cultur abgestorben.	1.71 ..
B. subtilis	Reichlich gewachsen, noch gut färbbare, schwach bewegliche Bacillen.	0.90 ..
B. wurzelförmig.	Reichlich gewachsen, noch gut färbbare, schwach bewegliche Bacillen.	1.65 ..
B. megaterium	Reichlich gewachsen, noch gut färbbare, kaum bewegliche, typische Bacillen.	0.42 ..
B. Trommelschl.	Dürrtig gewachsen, noch gut färbbare, lebende Bacillen.	0.56 H_2SO_4
B. Milchsäure	Reichlich gewachsen, im Agar Gasblasen, vorzüglich färbbare, lebende Bacillen	3.04 NaOH
Weisse Hefe	Reichlich gewachsen, noch lebende, sprossende Hefe.	1.19 H_2SO_4

II. Controle brauchte vor der Impfung 0.32^{ccm} $\frac{1}{10}$ Normal- H_2SO_4 , nach 35 Tagen 0.30^{ccm} H_2SO_4 ; sonach Gehalt des Glycerin-Agar an NaOH = 0.0120 Procent; verwendet wurden gewöhnliches Pepton und eben-solches Glycerin.

	Zustand der Cultur zu Ende des Versuches	Verbrauch für 10 ^{ccm}
Sp. Cholera	Reichlich gewachsen, gut färbbare, ebenso bewegliche Spirillen.	1.11 NaOH
Sp. Finkler-Prior	Mässig gewachsen, nur wenige noch gut färbbare, ebenso bewegliche Spirillen.	1.33 „
B. Metschnikoff	Reichlich gewachsen, gut färbbare, vorzüglich bewegliche Bacillen	0.25 „
B. Emmerich	Reichlich gewachsen, im Agar Gasblasen, sehr gut färbbare, lebende Bacillen.	3.35 „
B. Typhus	Reichlich gewachsen, vorzüglich färbbare, ebenso bewegliche Bacillen.	3.05 „
B. Brieger	Reichlich gewachsen, im Agar Gasblasen, vorzüglich färbbare, lebende Bacillen.	3.67 „
B. Ribbert	Reichlich gewachsen, sehr gut färbbare, lebende Bac.	3.07 „
B. Milzbrand	Reichlich gewachsen, noch gut färbbare, sporentragende Bacillen.	0.15 „
B. Friedländer	Mässig gewachsen, im Agar Gasblasen, noch sehr gut färbbare, lebende Bacillen.	1.20 „
B. pyocyaneus	Reichlich gewachsen, noch vorzüglich färbbare, ebenso bewegliche Bacillen, reichliche Farbstoffproduction.	1.43 H_2SO_4
B. capsul. Pfeiffer	Reichlich gewachsen, im Agar Gasblasen, noch gut färbbare, lebende Bacillen.	0.70 NaOH
M. tetragenus	Mässig gewachsen, noch sehr gut färbbare, in Theilung begriffene Meristen.	1.92 „
Sp. Denecke	Mässig gewachsen, noch vorzüglich färbbare, ebenso bewegliche Spirillen.	0.32 „
B. subtilis	Reichlich gewachsen, noch vorzüglich färbbare, ebenso bewegliche Bacillen.	1.15 „
B. wurzelförmig.	Reichlich gewachsen, noch vorzüglich färbbare, mässig bewegliche Bacillen.	0.95 „
B. megaterium	Reichlich gewachsen, noch sehr gut färbbare, typisch wacklig bewegliche Bacillen.	1.12 „
B. Trommelschl.	Dürftig gewachsen, noch sehr gut färbbare, lebende Bacillen.	0.60 H_2SO_4
B. Milchsäure	Reichlich gewachsen, im Agar Gasblasen, noch vorzüglich färbbare, lebende Bacillen.	1.95 NaOH
Weisse Hefe	Reichlich gewachsen, sehr gut färbbare, in Sprossung begriffene Hefe.	1.22 H_2SO_4

III. Controle brauchte vor der Impfung 0.19^{cem} $\frac{1}{10}$ Normal- H_2SO_4 , nach 35 Tagen 0.20^{cem} H_2SO_4 ; sonach Gehalt des Glycerin-Agar an NaOH = 0.0080 Procent; verwendet wurden reinstes Pepton von Witte und krystallisirtes Glycerin von Sarg.

	Zustand der Cultur zu Ende des Versuches	Verbrauch für 10 ^{cem}
Sp. Cholera	Gut gewachsen, noch vorzüglich färbbare, obenso bewegliche Spirillen.	1.10 NaOH
Sp. Finkler-Prior	Mässig gewachsen, nur wenige noch gut färbbare, fast nicht mehr bewegliche Spirillen.	1.47 „
B. Metschnikoff	Gut gewachsen, noch sehr gut färbbare, ebenso bewegliche Bacillen.	0.52 „
B. Emmerich	Gut gewachsen, noch gut färbbare, lebende Bacillen.	2.90 „
B. Typhus	Ziemlich gut gewachsen, noch gut färbbare, ebenso bewegliche Bacillen.	2.97 „
B. Brieger	Gut gewachsen, noch gut färbbare, lebende Bacillen.	2.05 „
B. Ribbert	Gut gewachsen, noch gut färbbare, lebende Bacillen.	2.67 „
B. Milzbrand	Gut gewachsen, Cultur nahezu abgestorben.	1.57 „
B. Friedländer	Gut gewachsen, noch gut färbbare, lebende Bacillen.	1.55 „
B. pyocyaneus	Reichlich gewachsen, vorzüglich färbbare, ebenso bewegliche Bacillen, reichliche Farbstoffproduction.	0.65 H_2SO_4
B. capsul. Pfeiffer	Reichlich gewachsen, noch vorzüglich färbbare, lebende Bacillen.	0.05 NaOH
M. tetragenus	Mässig gewachsen, vorzüglich färbbare, in Theilung begriffene Meristen.	2.75 „
Sp. Denecke	Gut gewachsen, noch gut färbbare, ebenso bewegliche Spirillen.	0.80 „
B. subtilis	Reichlich gewachsen, noch gut färbbare, mässig bewegliche Bacillen.	1.15 „
B. wurzelförmig.	Reichlich gewachsen, noch gut färbbare, mässig bewegliche Bacillen.	1.22 „
B. megaterium	Recht gut gewachsen, noch gut färbbare, typisch bewegliche Bacillen.	1.92 „
B. Trommelschl.	Mässig gewachsen, noch gut färbbare, lebende Bacillen.	0.47 H_2SO_4
B. Milchsäure	Gut gewachsen, vorzüglich färbbare, lebende Bacillen.	2.77 NaOH
Weisse Hefe	Reichlich gewachsen, noch in Sprossung begriffene, lebende Hefe.	0.42 H_2SO_4

Da sich in allen vorstehenden Versuchen die Resultate sehr gleichartig gestalten, so lassen sich dieselben gemeinschaftlich discutiren. Die wichtigste Thatsache, die sich ergibt, ist, dass von den untersuchten 19 Species deren 16, ausser den alkalischen Stoffwechselproducten aus dem Glycerin so viel Säure producirt hatten, dass zum Schlusse der Versuche saure, theilweise sogar stark saure Reaction der Nährböden nachweisbar war; natürlich wurde bei den Titrationen nur die freie Säure, nicht aber diejenige Menge Säure, die zum Neutralisiren der alkalischen Stoffwechselproducte verbraucht worden war, ermittelt; somit muss die Menge der überhaupt gebildeten Säure noch grösser sein, als die den gefundenen Verbrauchsziffern an Natron entsprechende. Da die Nährböden ursprünglich alkalisch reagirten, so war den bei den Titrationen gefundenen Zahlen eine, der für die Neutralisation des Nährbodens als solchen erforderlichen Menge Schwefelsäure, äquivalente Menge Natron zuzuzählen. Die auf den glycerinhaltigen Nährböden producirten Säuremengen sind weitaus grösser als die von Petruschky¹ in Lackmusmolke beobachteten, und stelle ich diejenigen Arten, die in beiderlei Arten von Nährböden Säure bilden, einander in der nachstehenden Tabelle gegenüber; die betreffenden Zahlen aus meinen Versuchen sind, um sie denjenigen von Petruschky vergleichbar zu machen, mit zehn multiplicirt. Es wurden verbraucht zur Neutralisation von je 100^{cem} Nährboden Cubikcentimeter $\frac{1}{10}$ Normal-NaOH:

Bei	Molke	Glycerin-Bouillon	Glycerin-Gelatine	Glycerin-Agar
B. Emmerich	7—8	20.0—22.7	50.2—60.1	29.0—36.2
B. Typhus	2—3	14.9—16.5	18.0—48.4	29.5—30.5
B. Brieger	12—13	20.5—26.9	26.2—29.4	20.5—36.7
B. Friedländer	3—4	15.7—26.5	13.8—15.8	12.0—22.3
B. capsul. Pfeiffer	12—13	20.2—30.7	0—33.5	0.5—8.5
M. tetragenus	1—2	7.5—11.9	33.5—54.4	19.5—30.4
B. Milchsäure	17—18	18.0—29.4	33.0—41.1	10.4—27.5

Aus dieser Vergleichung ergibt sich eine so bedeutende Ueberlegenheit in der Nährtüchtigkeit der gebräuchlichen Nährböden gegenüber Petruschky's Lackmusmolke, dass ich dem diesbezüglich von mir in meiner ersten Mittheilung Gesagten nichts hinzuzufügen habe; unter den

¹ *Centralblatt für Bakteriologie*. Bd. VII. S. 53.

drei Arten von glycerinhaltigen Nährböden steht die Gelatine ebenso obenan, wie das unter den glycerinfreien der Fall gewesen war.

Mit Rücksicht auf den ursprünglichen Alkalitätsgrad des betreffenden Nährbodens ergaben sich bezüglich der Menge an producirtter Säure keine einfachen Gesetzmässigkeiten. In Glycerinbouillon fanden sich bei höherem Alkaligehalt bei acht Arten, nämlich bei Cholera, Finkler, Emmerich, Brieger, Capsulatus, Tetrigenus, Denecke und Milchsäure, grössere Mengen von Säure, gleichfalls bei acht Arten, nämlich bei Metschnikoff, Typhus, Ribbert, Milzbrand, Friedländer, Subtilis, Wurzelförmigem und Megaterium, dagegen kleinere Mengen von Säure; drei Arten, Pyocyaneus, Trommelschlägerförmiger und weisse Hefe, hatten es nur zur Alkalibildung gebracht, doch war wenigstens bei Pyocyaneus die Menge des gebildeten Alkali geringer als in glycerinfreier Bouillon, nämlich nur 0.54^{cem} H_2SO_4 bei 0.71^{cem} H_2SO_4 für den Nährboden allein gegenüber 1.85^{cem} H_2SO_4 bei 0.81^{cem} H_2SO_4 für den Nährboden allein.¹ Vielleicht ist demzufolge auch bei Pyocyaneus Säurebildung aus Glycerin anzunehmen.

In Glycingelatine geben von 19 Arten deren elf, nämlich Cholera, Metschnikoff, Emmerich, Brieger, Ribbert, Milzbrand, Friedländer, Capsulatus, Tetrigenus, Wurzelförmiger und Milchsäure, grössere Säuremengen; deren fünf, nämlich Finkler, Typhus, Denecke, Subtilis und Megaterium, verhielten sich entgegengesetzt; dieselben drei Arten, die es in Glycerinbouillon nur zur Bildung von Alkali gebracht hatten, gaben auch in Glycingelatine Alkali, jedoch waren die betreffenden Mengen geringer als in gewöhnlicher Gelatine.

In Glycerin-Agar producirten bei höherem Alkaligehalte des Nährbodens von 19 Arten nur drei, nämlich Typhus, Brieger und Subtilis, mehr Säure; 13 Arten, nämlich Cholera, Finkler, Metschnikoff, Emmerich, Ribbert, Milzbrand, Friedländer, Capsulatus, Tetrigenus, Denecke, Wurzelförmiger, Megaterium und Milchsäure, lieferten weniger Säure; dieselben drei Arten, die in den beiden anderen glycerinhaltigen Nährböden Alkali produciren, thun dies auch in Glycerin-Agar; bei Pyocyaneus und Trommelschlägerförmigem ist jedoch die betreffende Menge gegenüber gewöhnlichem Agar beträchtlich kleiner.²

Neben der einfachen Thatsache, dass von der weitaus grössten Zahl der von mir untersuchten Arten freie Säure producirt wird, ist es von grösster Wichtigkeit zu constatiren, dass selbst stark saure Culturen nur ausnahmsweise abgestorben waren; es war dies der Fall in Glycerinbouillon in allen drei Versuchsreihen bei Finkler, in Reihe III auch bei Subtilis, in

¹ Vgl. I. Mitth. in *dieser Zeitschrift*. Bd. XII. S. 278. Reihe I u. II.

² Vgl. I. Mitth. S. 279. Reihe II.

Glyceringelatine nur in Reihe III bei Finkler, Ribbert und Denecke, in Glycerin-Agar in Reihe I bei Finkler und Denecke, in Reihe III bei Milzbrand. Hiernach vermögen die 16 aus Glycerin Säure producirenden Arten sich auch längere Zeit auf saurem Nährboden zu erhalten.

Ueber die Natur der gebildeten Säure will ich mich zunächst enthalten, auch nur eine Vermuthung auszusprechen; doch will ich darauf hinweisen, dass nach meinen früheren Versuchen von den 16 Säurebildnern alle mit Ausnahme von Milzbrand und Tetragenus bei den Versuchen in Rosolsäurehaltigen Nährböden ausgesprochenes Reductionsvermögen erkennen liessen. So gut dieselben die Spaltung der Eiweisskörper auf dem Wege der Reduction fertig bringen, so gut kann auch die Säurebildung aus Glycerin durch anfängliche Reduction desselben erfolgen und dann liesse sich a priori die Natur der Säure wohl vermuthen. In wie weit sich etwa solche Vorgänge mit den von Fitz¹ bei der Vergährung des Glycerins beobachteten decken, lasse ich gleichfalls unentschieden. So viel darf schon jetzt behauptet werden, dass unsere bisherigen Ansichten über den schädigenden Einfluss, den freie Säuren im allgemeinen auf Mikroorganismen ausüben, wesentliche Einschränkungen werden erleiden müssen; nicht bloss die Säure der Kartoffeln,² die, wie Hirsch³ und H. Ludwig⁴ nachgewiesen haben, Aepfelsäure ist, sondern auch andere mehr werden dem Wachsthum der Bakterien keine so grossen Schwierigkeiten bereiten. Die diesbezüglich in die Lehr- und Handbücher übergegangenen Ansichten⁵ über Wirkungen von Säuren⁶ überhaupt, wohl auch der Säure des Magensaftes, bedürfen gewiss mancher Berichtigung, wie dies auch schon aus Versuchen Schlüter's⁷ hervorgeht.

Ich bin begreiflicher Weise nicht im Stande, die grosse Zahl von Versuchen, die zur Darstellung und genauen Charakterisirung der meinen obigen Angaben zufolge aus Glycerin entstehenden Säure erforderlich werden, auf einmal einzuleiten; ich habe mich vielmehr dem genauen Studium der Verhältnisse bei der in meinen Reihen obenan stehenden Species, der Cholera zugewendet, weil mir erstens aus dem vorigen Jahre

¹ Vgl. die Litteratur-Angaben in Flügge's *Mikroorganismen*, 33.

² Vgl. hierüber bezüglich Cholera: Krannhals, *Centralblatt für Bakteriologie*, 1893, Nr. 2 und Voges, *ebenda*, Nr. 17.

³ *Ann. Chem. Pharm.* Bd. LI. S. 246.

⁴ *Ann. Pharm.* [2.] Bd. CVII. S. 10.

⁵ Vgl. Flügge, *Mikroorganismen*, S. 433 und C. Fränkel, *Grundriss*, 3. Aufl., S. 354.

⁶ Vgl. bezüglich Cholera und Typhus: Kitasato, *diese Zeitschrift*, Bd. III, S. 404 und Bd. V, S. 491.

⁷ *Centralblatt für Bakteriologie*. Bd. XI. S. 589.

verschiedene Arten von Cholera zum Vergleiche zur Verfügung standen, und weil gerade bei Cholera die Natur der Säure, die sichtlich anstandslos ertragen wird, von allergrösster Bedeutung ist. Da der biologische Theil dieser Arbeit bereits beendet ist, so hoffe ich, bald über die einschlägigen Versuche berichten zu können.

Meinem geehrten Herrn Collegen Professor Weichselbaum sage ich für die mir auch dieses Jahr gestattete Benutzung seiner Arbeitsräume meinen besten Dank.

Wien, 25. Juli 1893.