Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel, sowie der Gebrauchsgegenstände.

Heft 4.

15. Februar 1906.

11. Band.

Beiträge zur Zersetzung der Futter- und Nahrungsmittel durch Kleinwesen.

Von

J. König und A. Spieckermann in Münster i. W.

VI. Über die Zersetzung von pflanzlichen Futtermitteln bei Luftabschluß.

Ausgeführt von H. Kutenkeuler.

In einer früheren von A. Olig¹⁾ ausgeführten Arbeit ist nachgewiesen worden, daß in Baumwollsaatmehl mit etwa 50 % Wasser sich die Zersetzung bei Luftabschluß auf eine teilweise Vergärung der Kohlenhydrate zu organischen Säuren, Wasserstoff und Kohlensäure beschränkte und die Proteine nur in geringem Grade angegriffen wurden. Proteinzersetzende obligate Anaerobier traten in diesem Falle nicht auf und die Reaktion blieb andauernd sauer.

Auch bei Luftzutritt trat anfangs eine saure Gärung ein. Dann entwickelten sich in den oberflächlichen Teilen des Mehles säurezerstörende Pilze und im Anschlusse daran proteinzersetzende Bakterien vom Typus des *Bacillus mesentericus vulgatus*, die das Protein in hohem Grade bis zu Ammoniak abbauten. Obligate Anaerobier hat Olig auch unter diesen Umständen nicht beobachtet.

Bei späteren Untersuchungen hat sich nun gezeigt, daß in dem bei Luftzutritt faulenden Baumwollsaatmehl, sobald die Reaktion der ganzen Masse alkalisch geworden ist, sich im Innern doch proteinzersetzende obligate Anaerobier entwickeln.

Da Olig's Beobachtungen über das Verhalten des Baumwollsaatmehls bei Luftabschluß sich auf einen einzigen Versuch beschränkten, so erschien es wünschenswert, die Vorgänge bei der Zersetzung dieses und ähnlicher Kraftfuttermittel unter Luftabschluß noch einmal genauer zu verfolgen.

Betreffs der früheren Literatur über die Vorgänge bei der Fäulnis und die Fäulnisbakterien sei auf die von Olig gegebene Zusammenstellung, sowie auf Lafar's Technische Mykologie Bd. III verwiesen.

Für unsere Untersuchungen sind eine Reihe der bei der Ölfabrikation verbleibenden Rückstände benutzt worden, nämlich Baumwollsaat-, Erdnuß-, Sesam-, Lein- Raps-, Rübsen-, Palmkern-, Palmnuß- und Kokosnußmehl, ferner das bei der Herstellung

¹⁾ Die Zersetzung pflanzlicher Futter- und Nahrungsmittel durch Bakterien. Inaugural-Dissertation Münster 1903; auch diese Zeitschrift 1903, 6, 193.

der Reisstärke bzw. des Kochreises abfallende Reismehl. Alle diese Futtermittel sind bekanntlich durch einen verhältnismäßig hohen Gehalt an Protein und Fett gekennzeichnet. Die verschiedenen Mehle wurden mit soviel Wasser durchfeuchtet, daß eine Vermehrung der Bakterien eintrat. Die faulenden Mehle wurden jeweilig auf die in ihnen enthaltenen Bakterien und ihre chemischen Veränderungen untersucht. Die Bedeutung der verschiedenen Bakterienarten für die beobachteten Zersetzungen wurde erforderlichenfalls durch Einwirkung ihrer Reinkulturen auf die sterilisierten Futtermittel zu ermitteln gesucht. Schließlich wurden mit Futtermitteln in verschiedenen Stufen der Zersetzung Fütterungsversuche vorgenommen.

Die Arbeit zerfällt also in einen bakteriologischen und einen chemischen Teil, verbunden mit Fütterungsversuchen:

I. Bakteriologische Untersuchungen.

Es sollte festgestellt werden, ob 1. die Zersetzung unter Luftabschluß auch bei anderen Kraftfuttermitteln in der von Olig nur gelegentlich an einer Probe Baumwollsaatmehl beobachteten Weise verläuft,

2. die Fäulnis bei Luftzutritt wirklich nur durch Aërobier bewirkt wird, oder ob hierbei nicht in späteren Stufen auch obligate Anaërobier mitwirken.

Alle im folgenden beschriebenen Versuche sind, soweit nicht anders angegeben ist, bei der für praktische Verhältnisse in Betracht kommenden Temperatur von etwa 15—20° durchgeführt.

Betreffs der Feuchtigkeit, die für die Entwicklung der Bakterien nötig ist, sind die Versuchsergebnisse W. Bremer's¹⁾ beim Baumwollsaatmehl von uns beim Sesammehl nachgeprüft und bestätigt worden, wie die folgende Übersicht zeigt:

Feuchtigkeit	Pilzentwicklung
13,3% . . .	keinerlei Entwicklung,
15,8 „ . . .	verschimmelt,
19,9 „ . . .	„
25,6 „ . . .	„
30,8 „ . . .	schwache Vermehrung von Bakterien,
36,4 „ . . .	starke „ „ „

Es liegt also auch bei dem Sesammehl das Feuchtigkeitsminimum für das Schimmeln bei etwa 14%, für die Vermehrung der Bakterien bei etwas über 30%. Durch einige Versuchsreihen mit Erdnuß- und Leinmehl ist ferner vor Einleitung der Hauptversuche festgestellt worden, ob der Feuchtigkeitsgrad auf die Zusammensetzung der Bakterienflora etwa einen ähnlichen Einfluß hat, wie nach unseren früheren Versuchen auf die der Schimmelpilzflora. Beim Erdnußmehl wurden Feuchtigkeitsgrade von 25%, 30%, 35%, 40%, 45% und 50%, beim Leinmehl solche von 30%, 35%, 40% und 50% angewendet. Die Erdnußmehlproben mit 25% und 30% Wasser zeigten auch nach drei Wochen keinerlei Bakterienentwicklung; dagegen war sie bei 35% schon kräftig, sodaß das Minimum zwischen 30% und 35% liegen dürfte. Beim Leinmehl war bereits bei 30% Wasser

¹⁾ Diese Zeitschrift 1901, 4, 721.

eine schwache Vermehrung der Bakterien sichtbar. Doch muß hierbei berücksichtigt werden, daß sich geringe Wassermengen in dem sehr stark zusammenbackenden Leinmehl schwer gleichmäßig verteilen lassen, sodaß die beobachtete geringe Vermehrung der Bakterien vielleicht auf stärkere Durchfeuchtung einzelner Teile zurückzuführen ist. Was die Flora betrifft, so waren die Arten in allen Proben der Mehle, in denen eine Vermehrung überhaupt eingetreten war, gleich. Ob das Verhältnis der Zahl der Individuen der verschiedenen Arten bei den verschiedenen Feuchtigkeitsgraden schwankte, ist zahlenmäßig nicht festgestellt worden. Nach dem mikroskopischen Bilde zu schließen, kamen aber auffällige Schwankungen nicht vor. Dagegen zeigte sich der Einfluß des verschiedenen Feuchtigkeitsgrades deutlich in der absoluten Zahl der Individuen, die mit zunehmender Feuchtigkeit stieg. Beim Erdnußmehl trat insofern ein Unterschied hervor, als in den Proben mit steigendem Wassergehalt die Proteinzersetzer sich schneller entwickelten und darin eine schnellere Fäulnis bewirkten als in den Proben mit geringerem Wassergehalt. So faulte die Probe mit 45 % Wasser merklich schneller als die mit 35 %, die mit 50 % wieder schneller als die mit 45 % Wasser.

Auf Grund dieser Vorversuche sind die Hauptversuche alle bei 50 % Feuchtigkeit ausgeführt worden, da sich in diesem Falle am besten eine gleichmäßige Mischung herstellen ließ und auch das bei geringen Feuchtigkeitsgraden durch das Zusammenbacken der Mehlteilchen oft störende Schimmeln erheblich gehemmt wurde. Bei Lein-, Palmnuß- und Kokosnußmehl reichen für diesen Zweck 50 % Wasser noch nicht aus, und es sind daher bei diesen Mehlen Mischungen mit 60—70 % Wasser angewendet worden.

Zum Anfeuchten der Mehle ist Leitungswasser, teils in natürlichem Zustande teils sterilisiert, verwendet worden. Es hat sich bei Vorversuchen ergeben, daß die Bakterienflora des Leitungswassers (in Münster) auf den Verlauf der chemischen Veränderungen in den Mehlen ohne Einfluß ist, daß dagegen die Zusammensetzung der Flora der faulenden Mehle bei Verwendung sterilisierten und nicht sterilisierten Wassers wechseln kann, was leicht verständlich ist. Entscheidend auf den Verlauf der Zersetzungen durch Bakterien wirkt, wie schon die Untersuchungen Olig's gezeigt haben, unter natürlichen Verhältnissen lediglich die chemische Zusammensetzung der Futtermittel. Vertreter der verschiedenen physiologischen Bakteriengruppen sind in den Futtermitteln stets vorhanden. Mit den von uns verwendeten Futtermehlen konnte man ebenso wie mit den Samen und Früchten, aus denen sie hergestellt werden, durch Anreicherungsverfahren mit geeigneten Nährlösungen nach Belieben saure Gärungen oder Proteinfäulnis der verschiedensten Art erzeugen. Andererseits enthält aber das Leitungswasser in Münster stets Vertreter der physiologischen Gruppe, die bei der Zersetzung der von uns untersuchten Futtermittel immer zuerst erscheint, nämlich der die Kohlenhydrate zu organischen Säuren und Gasen vergärenden Bakterien. Aus diesem Grunde ist eine Abweichung im Verlaufe der chemischen Vorgänge bei Durchfeuchtung der Futtermittel mit keimfreiem oder mit Leitungswasser ausgeschlossen, während in der floristischen Zusammensetzung der physiologischen Bakteriengruppen bisweilen merkliche Unterschiede hervortraten. Insbesondere die eine starke Gasgärung der Kohlenhydrate hervorruhenden Stäbchen aus der Gruppe des *Bacterium coli* und *Bacterium lactis aërogenes* traten bei Verwendung von nicht sterilisiertem Leitungswasser stärker in den Vordergrund als bei Verwendung von

keimfreiem Wasser. Doch ist hierbei anscheinend auch wieder die chemische Zusammensetzung der Mehle von Bedeutung. Im Lein-, Raps- und Rübsenmehl, die in den von uns untersuchten Proben bei Verwendung von sterilisiertem Wasser sehr selten und dann auch nur Spuren von Gasentwicklung zeigten, trat diese auch bei Verwendung nicht sterilisierten Wassers nicht in höherem Maße ein.

Es ist daher zur Anfeuchtung der Futtermehle bei den Hauptversuchen stets nicht sterilisiertes Leitungswasser verwendet worden, zumal diese Art der Versuchsanordnung zweifellos den natürlichen Verhältnissen am nächsten kommen wird.

Unter Berücksichtigung der eben geschilderten Ergebnisse der Vorversuche sind die Hauptversuche in folgender Weise angeordnet worden:

1. Von Kokosnuß-, Palmnuß- und Leinmehl wurden Proben mit 60 % Wasser, von den übrigen Mehlen solche mit 50 % Wasser sehr fest, möglichst ohne Lufteinschluß in Reagensgläser gedrückt und unter Luftabschluß mit alkalischer Pyrogallussäure, in sauerstofffreier Atmosphäre stehen gelassen. In bestimmten Zwischenräumen wurde der Inhalt je eines Rohres bakteriologisch untersucht.

2. Reis-, Raps-, Rübsen-, Kokosnuß- und Palmnußmehl mit 50 % Feuchtigkeit wurden in größeren Mengen in einer etwa 5 cm dicken Schicht bei Luftzutritt fäulen gelassen.

Die bakteriologische Untersuchung sowohl der äußeren wie der inneren Teile der Masse wurde in Zwischenräumen ausgeführt.

3. Erdnuß-, Sesam-, Rübsen- und Palmkernmehl wurden mit 50 % Wasser, Lein- und Kokosnußmehl mit 70 % Wasser in hohe Bechergläser fest eingestampft und an der Luft stehen gelassen. Die Untersuchung wurde zeitweilig sowohl von der oberen Schicht wie vom Innern ausgeführt.

Außer diesen Versuchsreihen, die lediglich bakteriologischen Zwecken dienten, sind auch die für die chemischen Untersuchungen angesetzten Proben bakteriologisch untersucht worden, wobei aber aus naheliegenden Gründen nur der Endzustand berücksichtigt werden konnte.

Für die bakteriologischen Untersuchungen sind sowohl die Mehle von der im chemischen Teile angeführten Zusammensetzung, als auch Proben anderer Herkunft verwendet worden, so daß die Untersuchungsergebnisse allgemeine Gültigkeit haben dürften.

Die bakteriologische Untersuchung geschah in der Weise, daß aus den zu prüfenden Schichten der zersetzten Mehle mit einem sterilisierten Spatel vorsichtig eine Probe entnommen und in sterilisiertem Leitungswasser verteilt wurde. Von dieser Aufschwemmung wurden gefärbte Präparate angelegt, um einen Überblick über die Verteilung der Formen zu erhalten und sodann in der bekannten Weise Platten gegossen. Als Nährböden verwendeten wir den üblichen 2 %-igen Fleischwasserpeptonagar und eine 10 %-ige Gelatine in Leitungswasser mit 0,5 % Pepton, 0,2 % Glykose, 0,1 % primärem Kaliumphosphat und 0,05 % Magnesiumsulfat, die mit Soda gegen Lackmus genau neutralisiert war.

Von einer genauen Bestimmung der rein gezüchteten Bakterienarten mußte abgesehen werden, da das ins Ungeheure wachsende Untersuchungsmaterial unmöglich nach dieser Richtung hin zu bewältigen war. Wir haben uns darauf beschränkt, die verschiedenen Bakterienarten soweit zu untersuchen, daß ihre Einreihung in eine

physiologische Gruppe möglich war. Wir haben geglaubt, auf eine völlige Differentialdiagnose um so mehr verzichten zu dürfen, als die floristische Zusammensetzung der Gruppen je nach den Verhältnissen wechseln dürfte; schon die oben erwähnten Erfahrungen mit sterilisiertem und natürlichem Leitungswasser deuten hierauf hin. Es sind daher bei den Untersuchungen der Bakterienarten folgende Punkte berücksichtigt worden: Gestalt, Schwärmfähigkeit, Bildung von Endosporen, Wachstum auf Agar- und Gelatineplatten, im Gelatinestich, im Glykoseagarstich, in Zuckerlösungen im Einhorn'schen Gärkölbchen, in Milch, in Zucker-, Lackmus-Bouillon, in 3 % iger Peptonlösung, in Peptonwasser oder Bouillon mit gekochtem Hühnereiweiß in hoher Schicht mit und ohne Zusatz von Zuckern unter Luftabschluß.

A. Bakterienflora bei der Zersetzung unter Luftabschluß.

Bei sämtlichen Futtermitteln trat in diesem Falle eine äußerlich bemerkbare tiefere Zersetzung nicht ein. Die Proben behielten ihre natürliche Farbe bis zum Abschluß des acht Monate fortgeführten Versuches. Ihre Reaktion war zu allen Zeiten stark sauer, ihr Geruch sauer, aber nie faulig und nicht unangenehm. In manchen von ihnen fand eine lebhafte Gasgärung statt, in anderen nicht. Sehr stark war die Gasgärung im Baumwollsaatmehl, Rapsmehl, Erdnußmehl, etwas schwächer im Palmnußmehl, Kokosnußmehl und Reismehl, ganz fehlte sie meist im Leinmehl; nur in seltenen Fällen trat in diesem Futtermittel eine örtlich begrenzte, ganz vereinzelte Gasblase auf. Da diese Beobachtung wiederholt gemacht wurde, so scheint die chemische Zusammensetzung der Mehle in dieser Beziehung von wesentlichem Einfluß zu sein, wenn wir zurzeit auch noch nicht sagen können, worin sie besteht. Abweichend von den anderen Futtermitteln bestand die Flora des Leinmehls stets fast ausschließlich aus Kokken, während Stäbchen nur selten und dann auch nur ganz vereinzelt auftraten. Diese Kokken, die auch in den anderen Futtermitteln stets in geringerer oder größerer Zahl gefunden wurden, vergären Zucker zu Milchsäure in starkem Grade ohne Gasentwicklung. Ob auch noch andere organische Säuren dabei entstehen, ist nicht festgestellt worden. Von diesen Kokken sind aus den verschiedenen Mehlen über zwanzig Stämme näher untersucht worden. Morphologisch unterschieden sich diese nicht. Sie wuchsen auf Platten von Gelatine und Agar in sehr kleinen kreisrunden Kolonien, vorwiegend im Innern des Nährbodens, in Agarstrichkulturen als kaum sichtbarer zarter Belag, im Gelatinestich längs des ganzen Stiches, aber nicht an der Oberfläche. Auf festen Nährböden lagen die Kokken meist in Haufen, in flüssigen bildeten sie kurze Ketten von zwei, selten auch längere von sechs bis acht Zellen. Gelatine verflüssigten sie nicht. Die größte Zahl der isolierten Stämme brachte Milch infolge Vergärung der Laktose zu Milchsäure zum Gerinnen. In Lösungen mit 5 % Glykose, 0,5 % Pepton und Nährsalzen wurde von einer größeren Zahl ebenfalls Säure gebildet, von einer kleineren auch in einer entsprechenden Lösung mit Laktose und von dreien auch in einer solchen mit Mannit. In zuckerfreien Nährlösungen wuchsen diese Kokken nicht. Die Stärke des Wachstums, die Schnelligkeit und der Umfang der Säuregärung war bei den einzelnen Stämmen sehr verschieden. Ob es sich um verschiedene Arten oder nur um Rassen handelte, ist nicht weiter untersucht worden. Die vielfachen Abstufungen und Übergänge im Gärvermögen lassen letzteres möglich erscheinen, zumal die große Variabilität der Milchsäurebakterien in dieser Beziehung genügend bekannt ist.

Abgesehen vom Leinmehl, das, wie erwähnt, fast ausschließlich diese Kokkenvegetation aufwies, wurden in allen anderen Futtermitteln Stäbchenbakterien gefunden, die Kohlenhydrate zu Säuren und Gasen vergoren, in Gestalt, Größe und Schwärmfähigkeit teils dem *Bacterium coli*, teils dem *Bacterium lactis aërogenes* ähnelten. Die weitaus größte Zahl dieser Bakterien zeigte folgenden Typus: schwärmfähig oder nicht schwärmfähig, peptonisieren Gelatine nicht, bringen Milch durch saure Gärung zum Gerinnen, vergären Glykose, zum Teil auch Laktose, zu Wasserstoff und Kohlensäure, wachsen bei Anwesenheit von Glykose gut anaërob, sonst aërob, erzeugen in 3%igem Peptonwasser meist Indol. Einer zweiten Gruppe fehlte die Fähigkeit, Zucker zu Gasen zu vergären, einer dritten, an Zahl geringeren Gruppe, außer der genannten Fähigkeit auch die, Milch durch Säuregärung zum Gerinnen zu bringen. Sie ließen die Milch auch bei langem Stehen unverändert, oder es trat allmählich eine Gerinnung bei neutraler oder schwachalkalischer Reaktion ein. Eine vierte Gruppe, deren Vertreter seltener beobachtet wurden, vergor zwar Glykose zu Kohlensäure, Wasserstoff und organischen Säuren, peptonisierte aber auch Gelatine. Die von Olig im Baumwollsaatmehl seinerzeit gefundenen und etwas genauer beschriebenen Arten sind auch in anderen Futtermitteln wiederholt beobachtet worden. Fassen wir unsere jetzigen Beobachtungen mit den früheren zusammen, so handelt es sich also um eine Gruppe von Stäbchenbakterien mit der ausgesprochenen Fähigkeit, Zucker zu organischen Säuren — Olig fand Essig- und Bernsteinsäure — unter Umständen auch zu Kohlensäure und Wasserstoff zu vergären, die dagegen Proteinstoffe nur in geringem Grade abzubauen vermögen, wofür auch Olig bereits Beweise geliefert hat.

Sämtliche Proben sind sodann wiederholt auf die Anwesenheit obligater Anaërobier in der Weise untersucht worden, daß ein großer Anteil einer wässerigen Aufschwemmung der Mehle in Agarröhrchen (Agar mit 1% Glykose) mit hoher Schicht verteilt, zehn Minuten auf 75°—80° erwärmt und dann bei 34° im Thermostaten längere Zeit aufbewahrt wurde. In keinem Falle ist eine Entwicklung solcher Bakterien beobachtet worden.

Mit der zunehmenden Säuerung fand in allen Futtermitteln ein Absterben der Bakterien statt. Manchmal blieben die Platten schon nach sechs Wochen steril, nach zehn Wochen wurde nirgends mehr eine Entwicklung von Kolonien der Säurebakterien beobachtet. Dagegen erschienen auf den Agarplatten so alter Kulturen stets vereinzelte Kolonien von Arten der Gruppe des *Bacillus mesentericus*. Sporen dieser Bakterien sind in allen Futtermitteln enthalten. Daß sich diese Pilze in den sauren Proben vermehrt haben sollten, ist wenig wahrscheinlich. Sie sind fast alle strenge Aërobier und gegen Säure sehr empfindlich. Allenfalls in den ersten Tagen könnten sie in den ja immerhin durch die Art der Herstellung schwach sauerstoffhaltigen feuchten Mehlen ein kümmerliches Dasein führen. Dagegen spricht auch der Umstand, daß sie zu dieser Zeit weder im mikroskopischen Bilde noch auf den Platten erscheinen. Die einfachste Erklärung für die einzelnen Kolonien aus alten Proben ist wohl die, daß die ursprünglich vorhandenen Sporen nach Aufhören der starken Konkurrenz durch die Säurebildner auf den Platten zu Kolonien sich entwickeln können.

B. Bakterienflora bei der Zersetzung unter Luftzutritt.

Beim Reis-, Rübsen-, Raps-, Kokosnuß- und Palmnußmehl, die unter reichlichem Luftzutritt in dünner Schicht von etwa 5 cm angesetzt waren, trat in der ersten Woche, wie bei den ganz unter Luftabschluß aufbewahrten Proben, eine saure Gärung auf, die durch Kokken und Stäbchen der eben beschriebenen Typen erzeugt wurde. An der Oberfläche der Proben entwickelte sich aber in allen Fällen eine üppige Vegetation von Schimmelpilzen, zuweilen auch Sproßpilzen. Nach zwei Wochen war die unter dieser Schimmeldecke sitzende Schicht der Mehle überall neutral oder schwach alkalisch, roch etwas faulig, war schmierig und verfärbt und im mikroskopischen Bilde erschienen neben den kurzen zarten Stäbchen der Säurebildner größere und längere Stäbchen. Die Kultur ergab, daß es sich um Vertreter der Gruppe der „Kartoffelbacillen“ handelte, die das Protein der Futtermittel zersetzten. Der innere Teil der Mehle war noch sauer und von natürlicher Farbe. Die alkalische, schmierige Schicht wuchs allmählich immer weiter in die Tiefe. Am schnellsten verlief die Fäulnis beim Kokosnußmehl, das schon nach zwei Wochen einen völlig alkalischen, faulen, stinkenden Brei bildete. Etwas weniger schnell faulten Rübsen- und Rapsmehl; sie waren erst nach drei bis vier Wochen völlig alkalisch. Dagegen blieben Reis- und Palmnußmehl lange Zeit sauer. Letzteres war erst in vier Monaten in allen Teilen schwach alkalisch, das Reismehl war zu dieser Zeit schon etwas stärker gefault. Sowohl der alkalische wie der saure Teil wurde auch bei diesen Proben häufiger auf obligate Anaerobier untersucht und es ergab sich, daß, sobald die Masse völlig alkalisch war, solche Bakterien zur Entwicklung gelangten und bald ganz die Oberhand gewannen.

Es sei hier gleich anschließend kurz erwähnt, daß die Fäulnis bei geringem Luftzutritt, also beim Aufbewahren der feuchten Mehle in hohen Bechergläsern, in derselben Weise verläuft, wie eben beschrieben wurde, nur mit dem Unterschiede, daß sie den Verhältnissen entsprechend langsamer in die Tiefe dringt und daß manche Futtermittel noch nach längerem Aufbewahren in dieser Weise in den tieferen Schichten eine saure Reaktion zeigen. Besonders hervorgehoben zu werden verdient, daß auch in diesem Falle das Leinmehl insofern eine Sonderstellung einnimmt, als seine Oberfläche sich erst nach langer Zeit mit Schimmel bedeckt und dementsprechend die Fäulnis sehr langsam verläuft.

Obligate Anaerobier sind in allen von uns untersuchten, ganz verfaulten Mehlen gefunden worden. Wir haben uns auf die Isolierung von Endosporen bildenden Arten beschränkt, zumal andere bisher mit Sicherheit kaum nachgewiesen worden sind. Zur Isolierung wurde Agar in hoher Schicht nach dem Vorgange von Liborius benutzt. Durch genügende Verdünnung läßt es sich leicht erzielen, daß in den Röhren nur wenige Kolonien vorhanden sind, die sich nach Zertrümmerung des Röhrchens bequem rein abstechen lassen. Zuweilen sind auch die von Streng¹⁾ vorgeschlagenen Doppelschalen benutzt worden, die ebenfalls recht brauchbar sind.

Die rein gezüchteten Anaerobier lassen sich in zwei Gruppen teilen: 1. solche, die Protein zersetzen, 2. solche, die dieses nicht zersetzen. Von diesen beiden Gruppen ist nur die erste in höherem Maße in den Kreis der Untersuchungen gezogen worden.

¹⁾ Diese Zeitschrift 1904, 8, 611.

Von der zweiten Gruppe sei nur erwähnt, daß sämtliche Kulturen zarte, schlanke Stäbchen zeigten, in denen eine etwa in der Mitte liegende, ovale Spore gebildet wurde, daß sie die Gelatine zum größten Teil nicht verflüssigten, Milch durch Säuregärung unter starkem Buttersäuregeruch zum Gerinnen brachten, aber nie faulig zersetzten, und in zuckerfreien Peptonlösungen suspendiertes Eialbumin nicht angriffen. Gas wurde von den meisten von ihnen in zuckerhaltigen Nährböden nicht erzeugt. Das Wachstum im Stich in hochgeschichtetem Agar begann erst tief unter der Oberfläche. Einen Übergang zur zweiten Gruppe bildeten einzelne Stämme, die die Milch ohne stärkere saure Reaktion zum Gerinnen brachten und, wie das Entstehen geringer Mengen von Ammoniak zeigte, anscheinend auch das Protein etwas zersetzten, ohne aber einen tieferen Zerfall mit unangenehmem Geruche zu bewirken. Von der die Proteinstoffe zersetzenden Bakteriengruppe sind aus den verschiedensten Futtermehlen bei verschiedenen Gelegenheiten 13 Bakterienstämme gezüchtet, die bei weiterer Untersuchung als gleichartig und bei Vergleich mit einer Kultur des *Bacillus putrificus* aus der Sammlung Král sich als mit diesem identisch erwiesen. Das schließt natürlich nicht aus, daß auch andere anaerobe Proteinzerersetzer in Futtermitteln zur Entwicklung gelangen. Immerhin scheint doch *Bacillus putrificus* der häufigste zu sein.

Sämtliche Stämme verflüssigten Gelatine, aber verschieden schnell. Bei manchen klärte sich die verflüssigte Gelatine schnell unter Absetzung eines dicken Bodensatzes, bei anderen blieb sie längere Zeit getrübt. Auf Agarplatten (nach Streng) wuchsen die Bakterien in unregelmäßig strahligen, nach allen Seiten verzweigten Kolonien. In hoher Schicht von Glykose-Agar, in Peptonlösungen mit verschiedenen, aber nicht allen Zuckern, riefen sie eine lebhaft Gasgärung unter Säuerung der Flüssigkeit hervor. Nähere Angaben hierüber folgen im nächsten Abschnitt. In verdünnter Bouillon oder Peptonwasser suspendiertes, gekochtes Hühnereiweiß und Fibrin wurden unter starker Gasentwicklung und ekelhaftem Geruch völlig zersetzt. Dagegen trat in einer rein unorganischen Nährlösung mit gekochtem Eialbumin kein Wachstum ein. In Milch wurde das Kasein gefällt und dann gelöst, so daß sie eine braune, ammoniakalisch und ekelhaft riechende, klare Flüssigkeit bildete.

Die Entwicklung der Bakterien ist sowohl in Bouillon als auch in Agar in hoher Schicht verfolgt worden. Als Ausgangsmaterial diente der zwei bis drei Monate alte, in Röhren mit verdünnter Bouillon und gekochtem Eiereiweiß abgesetzte Bodensatz, der zum größten Teil aus den Sporangien des Pilzes bestand. Diese bleiben auch nach völliger Ausbildung der Spore erhalten und umschließen letztere bis zur Keimung. Sie sind durchgängig an der einen Seite keulenartig aufgetrieben (Trommelschlägelform) und 4—5 μ lang, im dünneren Teil 0,5—1,2 μ , im Kopfteil 1,2—2,5 μ dick; seltener sind Sporangien ohne die keulenartige Erweiterung. Die in ihnen enthaltenen Sporen sind oval, mit glatter Membran, meist 1,75 μ lang und 1,25 μ dick. Mit Anilinfarben, sowie mit Jodjodkaliumlösung färben sich die Membranen der Sporangien und Sporen, während irgendwelche Inhaltsstoffe bei den ersteren nicht mehr zu erkennen sind. Die Keimung erfolgt in der Weise, daß die Spore allmählich an Größe zunimmt, gleichzeitig Anilinfarben aufzunehmen beginnt und direkt ein Stäbchen bildet, ohne daß ein Abstreifen der Sporenmembran zu beobachten wäre. Die Membran der Sporangien scheint zu verquellen: jedenfalls findet man sie später nicht mehr. Ob diese Keimstäbchen, die merklich dicker sind als die später gebildeten, sofort schwärmen, ist nicht festgestellt worden. Färbt man sie mit verdünnter Methylenblaulösung nach

A. Meyer¹⁾, so färben sie sich vollständig, doch werden ein, zwei, zuweilen auch drei kugelige Gebilde besonders dunkel gefärbt. Diese geben alle Reaktionen des von A. Meyer genauer beschriebenen Volutins und sind daher wohl als solches anzusprechen. Nach etwa 16 Stunden findet man in Bouillonkulturen, die bei 34° gewachsen sind, zwei- bis vierstäbige Verbände mit Stäben von 4—5 μ Länge und 0,5—1 μ Dicke, ferner einzelne Stäbe, Verbände mit zweizelligen Stäben und vielzellige Fäden bis zu 60 μ Länge. Alle Formen sind in lebhaftem Schwärmen und besitzen, wie durch die Geißelfärbung nach Löffler leicht zu zeigen ist, zahlreiche peritrich angeordnete Geißeln. Nach 22 Stunden sieht man vorwiegend einzelne Schwärmer, die an einem Ende etwas angeschwollen sind und schon dadurch den Beginn der Sporenbildung verraten. Nach 40 Stunden findet man schwärmende Sporangien mit deutlich abgegrenzter Spore, nach 64 Stunden sind die fertigen Sporangien zur Ruhe gelangt. Irgendwelche Inhaltsstoffe, wie Fett, Glykogen, Jogen, Volutin, konnten in den Stäbchen und Sporangien zu keiner Zeit nachgewiesen werden. Die Färbung mit verdünnten Anilinfarben ist meist nicht gleichmäßig in den Stäbchen; wodurch aber die verschiedenartige Färbbarkeit des Zellinhaltes bedingt wurde, war nicht zu ergründen. Die Sporenbildung läßt sich durch Färbungen bis zu einem gewissen Grade verfolgen. Färbt man Bakterien aus Kulturen, die 36—40 Stunden bei 34° gestanden haben, vorsichtig nach Gram, so wird die Zellmembran stark violett, das Innere schwach violett gefärbt. In den Stäbchen, in denen die Sporenbildung beginnt, sieht man dann gegen das etwas verdickte Ende zuweilen einen oder auch mehrere dunkler gefärbte kugel- oder linsenförmige Körper. Entfärbt man sehr stark, so erscheinen die Zellen bis auf die Membran und diese Massen ungefärbt. In einer größeren Anzahl von Stäbchen dagegen sieht man an einem Ende einen von dem dunkleren Plasma sich deutlich abhebenden, ovalen, heller gefärbten Teil, in dessen Mitte ein oft erheblich dunkler gefärbter Kern liegt, dessen Größe sehr verschieden ist. Eine scharfe Abgrenzung des helleren Teiles gegen das dunklere Plasma durch eine Membran ist zunächst nicht zu sehen. Seltener erhält man auch Bilder, in denen das Plasma heller, der abgegrenzte Teil dunkler gefärbt ist, in dem dann wieder ein oder zwei noch stärker gefärbte Kerne zu sehen sind. Etwas später zeigt sich eine stark violett gefärbte Membran um die Sporenanlage, deren Inneres, bis auf den noch immer sehr stark sich färbenden Kern, den Farbstoff jetzt nur noch schwach aufnimmt. Schließlich verschwindet auch der Kern und nur die Sporenmembran ist gefärbt. Die Sporangien bleiben farblos, und nur ihre Membran färbt sich kräftig. Untersucht man Sporangien nach etwa 70 Stunden, so bleiben die Sporen ungefärbt, das Plasma des Stäbchens färbt sich matt, zeigt aber zahlreiche schwach gefärbte Vakuolen und zuweilen einzelne dunkler gefärbte Stellen kleineren oder größeren Umfanges, die bei stärkerer Entfärbung allein gefärbt bleiben. Besonders um die Spore herum sieht man oft eine dunklere Färbung im Plasma.

Färbt man nicht zu alte Sporangien nach A. Meyer mit Formalin und verdünnter Fuchsinlösung, so werden die Sporenanlagen je nach dem Alter nicht mehr, oder nur schwach gefärbt; in letzterem Falle zeigt sich in ihrer Mitte stets ein stark gefärbter Kern. Das Plasma des Sporangiums erscheint mattrosa. In ihm liegen oft ein bis drei meist der Membran angelagerte, dunkelrot gefärbte Körper, über deren Natur nichts festzustellen war.

¹⁾ A. Meyer, Praktikum der botan. Bakterienkunde 1903.

Betreffs des physiologischen Verhaltens wird in einem der folgenden Abschnitte weiteres mitgeteilt werden.

Die wesentlichen Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen sind also folgende:

1. In den Futtermitteln sind die zu ihrer Zersetzung befähigten Bakterien stets enthalten.

2. Diese vermehren sich bei einem Feuchtigkeitsgehalt der Futtermittel von etwas über 30 %.

3. In sämtlichen Futtermitteln kommen sowohl bei Luftzutritt wie bei Luftabschluß zunächst Kokken- und Stäbchenbakterien zur Entwicklung, die die Kohlenhydrate zu Säuren und Gasen vergären.

4. Bei Luftabschluß bleiben sie die einzige Flora.

5. Bei Luftzutritt dagegen entwickeln sich an der Oberfläche Eumyceten, die die organischen Säuren zerstören. Darauf vermehren sich die Protein zersetzenden aeroben Vertreter der Kartoffelbacillengruppe, unter deren Einfluß die Reaktion der faulenden Masse allmählich nach innen zu alkalisch wird. Sobald dieses geschehen ist, entwickeln sich die obligaten Anaerobier.

6. Die Anaerobier sind teils Buttersäuregärer ohne Einfluß auf die Proteine, teils Proteinzer-setzer.

7. Der häufigste anaerobe Proteinzer-setzer scheint *Bacillus putrificus* zu sein.

II. Chemische Untersuchungen.

Über die angewendeten Untersuchungsverfahren sei folgendes vorausgeschickt:

Die quantitativen Bestimmungen der Gesamt-Stickstoffsubstanz, des Fettes, der Mineralstoffe, sowie der Säuren wurde nach den üblichen Verfahren ausgeführt. Das Reineiweiß wurde nach Stutzer-Barnstein gefällt, die Pentosane wurden durch Fällen des Furfurols mit Phloroglucin und Berechnung nach den von Tollens¹⁾ aufgestellten Tabellen, die Rohfaser mit Glycerin-Schwefelsäure nach J. König²⁾ bestimmt. Da die so erhaltenen Werte für Rohfaser besonders bei den gefaulten Mehlen häufig schlecht übereinstimmten, wurden die abgewogenen 3 g Mehl zunächst in einer Porzellanschale mit Oxalsäure und Wasser mehrmals zur Trockne verdampft, um so eine feinere Zerkleinerung und damit bessere Einwirkung der Glycerin-Schwefelsäure zu erzielen. Die stickstofffreien Extraktstoffe wurden, wie üblich, aus der Differenz: Trockensubstanz — (Rohprotein + Fett + Pentosane + Rohfaser + Asche) berechnet.

Die qualitative Untersuchung der Zersetzungserzeugnisse von Proteinstoffen wurde nach den von Hoppe-Seyler³⁾ und E. Salkowski⁴⁾ beschriebenen Verfahren ausgeführt.

¹⁾ Journ. f. Landw. 1900, 48, 357.

²⁾ Diese Zeitschrift 1898, 1, 1.

³⁾ Hoppe-Seyler's Handbuch d. physiologisch-u. pathologisch-chem. Analyse. 7. Aufl. 1903.

⁴⁾ E. Salkowski, Praktikum d. physiol. u. pathol. Chemie. 2. Aufl. 1900.

A. Untersuchungen über die Zersetzungen in den Futtermitteln.

Erste Versuchsreihe.

Die Zersetzung der Futtermittel unter völligem Abschluß der Luft.

Von Baumwollsaat-, Erdnuß-, Sesam-, Rübsen-, Raps-, Reis-, Kokosnuß-, Palmkern-, Palmnuß- und Leinmehl wurden 250—350 g, je nach dem Volumen, mit etwa 50 % Wasser, bei den schwerer zu befeuchtenden mit 60 bis 70 % in Bechergläser fest eingedrückt und in einer durch Pyrogallussäure vom Sauerstoff befreiten Atmosphäre etwa zwei Monate stehen gelassen.

Bei allen Mehlen war während dieser Zeit die Farbe normal geblieben; die Reaktion war mehr oder weniger stark sauer; nur bei Kokosnußmehl in der Oberflächenschicht neutral, innen schwach sauer, Palmnuß-, Raps- und Rübsenmehl zeigten schwache Gasentwicklung, bei Palmkern- und Kokosnußmehl fehlte diese, während sie bei Baumwollsaat-, Erdnuß-, Reis-, Sesam- und Leinmehl sehr stark hervortrat. Bei Baumwollsaat-, Raps-, Erdnuß- und Rübsenmehl war auch die mit einem zinnoberhaltigen Fettstift gemachte Aufschrift an den Gläsern geschwärzt; es hatte hier also jedenfalls eine Schwefelwasserstoffentwicklung stattgefunden.

Die bakteriologische Untersuchung der Proben stieß insofern auf Schwierigkeiten, als die meisten Bakterien durch die andauernde Wirkung der Gärungssäuren abgestorben waren. Auf den Agarplatten wuchsen aus Raps-, Rübsen-, Sesam-, Erdnuß- und Leinmehl vorwiegend Kolonien von Kokken, aus den anderen Mehlen nur vereinzelte Kolonien von Kartoffelbacillen. Obligate Anaerobier wurden nicht beobachtet. Es mußte daher die rein mikroskopische Untersuchung herangezogen werden, die im wesentlichen das Bild ergab, das bereits im bakteriologischen Teil dieser Arbeit für die unter Luftabschluß gefauten Proben gezeichnet ist.

Da die Mengen der zu den Versuchen verwendeten Futtermehle nicht genau festgestellt waren, so wurde für die Bilanzaufstellung die Voraussetzung gemacht, daß die Menge der Asche unverändert geblieben war; die Mengen der organischen Stoffe der zersetzten und der natürlichen Mehle wurden daher auf gleiche Aschenmengen umgerechnet. Wenn diesem Verfahren auch wesentliche Fehler nicht anhaften dürften, so sind doch vielleicht hierauf einige Unregelmäßigkeiten in den folgenden Tabellen zurückzuführen; das Endergebnis dürfte indes durch sie nicht wesentlich berührt werden.

Die Untersuchungsergebnisse sind in den Tabellen I (S. 188), II (S. 189) und III (S. 190 u. 191) zusammengestellt.

Aus diesen Tabellen geht hervor, daß eine wesentliche Zersetzung der organischen Stoffe unter den eingehaltenen Versuchsbedingungen nicht stattgefunden hat. Der Verlust an Trockenmasse bleibt meist unter 5 % und erreicht nur einmal 6,5 %. Es unterscheidet sich in dieser Beziehung die Fäulnis unter völligem Luftabschluß wesentlich von der unter Luftzutritt, bei der die Trockenmasse unter Umständen um über 30 % abnimmt. Den Hauptanteil an dem Massenverlust tragen die sogenannten stickstofffreien Extraktstoffe, die bei den meisten Mehlen zu einem Viertel bis zur Hälfte verschwunden sind. Auch die Pentosane haben in allerdings sehr wechselndem Maße abgenommen. Dagegen zeigt einen stärkeren Verlust an Fett nur das Rapsmehl. Der Gesamt-Stickstoff hat wesentliche Veränderungen nicht

erfahren. Dagegen hat ein teilweiser Abbau der Proteinstoffe fast überall stattgefunden, der im Reis- und Sesammehl sogar bis zu erheblicher Höhe steigt. Im wesentlichen ist dieser Abbau anscheinend bei den höher organisierten Stickstoffverbindungen stehen geblieben. Etwas Ammoniak ist überall entstanden, doch beträgt der Ammoniak-Stickstoff von dem an Reinprotein verloren gegangenen Stickstoff bei den meisten Mehlen 15—20 0/0, bei Rübsen- und Erdnußmehl etwa 30—35 0/0 und nur bei Raps- und Palmnußmehl etwa 100 0/0.

Der Verlauf dieses Versuches zeigt, daß bei allen verwendeten Futtermitteln, wie bereits nach den bakteriologischen Untersuchungen zu vermuten war, bei freiwilliger Zersetzung unter völligem Luftabschluß eigentliche Fäulnis, d. h. tiefgehende Zersetzung, in erster Linie der Proteinstoffe unter Auftreten einer alkalischen Reaktion und eines faulen Geruches, nicht stattfindet, und daß unter diesen Umständen die streng anaëroben Proteinzerersetzer überhaupt nicht zur Entwicklung gelangen.

Tabelle I.

Prozentuale Zusammensetzung der zu den Versuchen angewendeten Mehle.

1. Natürliche Substanz.

No.	Bezeichnung	Wasser	Rohprotein	Reinprotein	Ätherextrakt	Stickstofffreie Extraktstoffe	Pentose	Rohfaser	Asche	Gesamtstickstoff
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
1	Baumwollsaatmehl . .	9,71	48,94	47,06	9,91	10,63	6,86	7,80	6,15	7,83
2	Erdnußmehl	10,32	49,79	49,00	7,95	16,43	6,04	5,23	4,24	7,97
3	Sesammehl	8,21	39,44	37,38	11,75	18,98	3,99	5,44	12,45	6,31
4	Rübsenmehl	9,29	34,63	31,31	8,01	17,62	7,41	13,51	9,53	5,54
5	Rapsmehl	9,05	32,19	27,56	8,31	21,06	7,51	13,58	8,30	5,15
6	Reismehl	10,28	12,38	12,13	11,78	35,04	8,68	11,42	10,42	1,98
7	Kokosnußmehl	11,98	20,81	20,44	7,10	36,38	2,34	15,50	5,89	3,33
8	Palmkernmehl	9,44	18,19	19,31	8,33	27,79	3,64	28,38	4,23	2,91
9	Palmnußmehl	10,42	16,94	16,94	6,88	36,93	5,23	18,86	4,74	2,71
10	Leinmehl	9,90	38,69	35,63	4,52	18,51	11,27	11,72	5,39	6,19

2. Trockensubstanz.

1	Baumwollsaatmehl . .	—	54,20	52,12	10,97	11,78	7,60	8,64	6,81	8,67
2	Erdnußmehl	—	55,52	54,64	8,86	18,33	6,73	5,83	4,73	8,89
3	Sesammehl	—	42,52	40,72	12,80	20,84	4,35	5,93	13,56	6,80
4	Rübsenmehl	—	38,79	34,50	8,83	18,82	8,17	14,89	10,50	6,21
5	Rapsmehl	—	35,39	30,30	9,14	23,14	8,27	14,93	9,13	5,66
6	Reismehl	—	13,80	13,52	13,13	39,06	9,67	12,73	11,61	2,21
7	Kokosnußmehl	—	23,64	23,22	8,07	41,33	2,66	17,61	6,69	3,78
8	Palmkernmehl	—	20,09	21,32	9,20	30,68	4,02	31,34	4,67	3,21
9	Palmnußmehl	—	18,91	18,91	7,68	41,33	5,84	20,95	5,29	3,03
10	Leinmehl	—	42,85	39,53	5,02	20,63	12,51	13,01	5,98	6,85

Tabelle II.
Prozentuale Zusammensetzung der unter Luftabschluß gefaulten Mehle.
1. Zusammensetzung der natürlichen gefaulten Substanz:

No.	Bezeichnung	Wasser %	Roh- protein %	Rein- protein %	Ammoniak- Stickstoff %	Ather- extrakt %	Freie ¹⁾ Fettsäure %	Ge- sante ²⁾ freie Säure %	Flüch- tige freie ²⁾ Säure %	Gebun- dene ²⁾ flüch- tige Säure %	Stick- stoff- freifex- trakt- stoffe %	Pento- sane %	Roh- faser %	Asche %	Ge- samt- Stick- stoff %
1	Baumwollsaatmehl . .	56,02	24,60	20,78	0,12	4,82	1,15	1,65	0,172	0,258	2,74	3,16	3,88	3,13	3,94
2	Erdnußmehl	54,80	25,57	19,12	0,26	3,81	3,54	2,06	0,172	0,275	6,46	2,38	2,68	2,24	4,09
3	Sesammehl	54,83	19,92	11,82	0,31	6,40	5,22	1,99	0,137	0,257	6,70	1,12	2,61	6,43	3,19
4	Rübenmehl	57,10	16,62	12,62	0,15	3,55	2,44	1,24	0,086	0,069	7,59	3,07	6,23	4,60	2,66
5	Rapsmehl	56,94	16,02	13,10	0,14	3,54	1,47	1,44	0,086	0,137	8,10	3,37	6,41	4,18	2,56
6	Reismehl	57,66	6,26	4,29	0,05	5,90	4,81	2,06	0,137	0,137	14,38	3,28	5,35	5,11	1,00
7	Kokosnußmehl . . .	75,00	7,57	6,85	0,04	2,23	2,30	0,62	0,103	0,120	6,84	0,73	5,07	1,94	1,21
8	Palmkernmehl . . .	69,30	7,03	6,28	0,02	2,82	2,48	0,45	0,103	0,206	8,15	1,54	9,18	1,53	1,12
9	Palmnußmehl . . .	64,80	7,34	7,01	0,02	2,59	2,33	0,45	0,069	0,189	11,96	1,92	8,22	2,72	1,17
10	Leinmehl	64,40	15,71	11,74	0,07	1,78	1,44	1,24	0,086	0,155	5,29	4,02	5,36	2,20	2,51
2. Zusammensetzung der Trockensubstanz:															
1	Baumwollsaatmehl . .	—	56,02	47,28	0,273	10,98	2,62	3,75	0,390	0,586	6,09	7,20	8,83	7,13	8,96
2	Erdnußmehl	—	56,60	42,32	0,575	8,43	7,84	4,56	0,381	0,608	14,27	5,26	5,92	4,96	9,06
3	Sesammehl	—	44,06	26,14	0,686	14,18	11,54	4,41	0,303	0,569	14,88	2,48	5,76	14,23	7,05
4	Rübenmehl	—	38,75	29,42	0,350	8,27	5,69	2,89	0,200	0,161	17,68	7,15	14,53	10,73	6,20
5	Rapsmehl	—	37,20	30,43	0,325	8,22	3,41	3,34	0,200	0,318	18,83	7,82	14,89	9,70	5,95
6	Reismehl	—	14,79	10,13	0,118	13,93	11,37	4,87	0,324	0,324	33,96	7,75	12,63	12,07	2,37
7	Kokosnußmehl . . .	—	30,28	27,42	0,160	8,94	9,19	2,47	0,412	0,480	27,33	2,92	20,30	7,76	4,84
8	Palmkernmehl . . .	—	22,90	20,46	0,065	9,18	8,08	1,45	0,336	0,671	26,55	5,03	29,90	4,99	3,66
9	Palmnußmehl . . .	—	20,86	19,81	0,057	7,35	6,61	1,27	0,195	0,537	36,11	5,45	23,36	5,60	3,34
10	Leinmehl	—	44,15	32,97	0,197	4,99	4,05	3,48	0,242	0,435	14,86	11,28	15,06	6,18	7,06

¹⁾ Als Ölsäure berechnet.²⁾ Als Essigsäure berechnet.

Tabelle III.

Absolute Mengen der unter Luftabschluß gefaulten Mehle an Bestandteilen vor und nach dem Versuch.

No.	Bezeichnung	Gesamt- Trocken- substanz	Roh- protein	Rein- protein	Ammo- niak- Stick- stoff	Äther- extrakt	Freie Fett- säure	Ge- samte freie Säure	Flüch- tige freie Säure	Gebun- dene flüch- tige Säure	Stick- stoff- freie Ex- trakt- stoffe	Pento- sane	Roh- faser	Asche	Gesamt- Stick- stoff
1	Baumwollsaatmehl:														
	Vor dem Versuch	354,93 g	192,28 g	184,99 g	—	38,96 g	—	—	—	—	41,88 g	26,97 g	30,66 g	24,18 g	30,760 g
	Nach dem Versuch	339,09 „	189,96 „	160,32 „	0,926 „	37,23 „	8,88 g	12,73 g	1,322 g	1,987 g	20,64 „	24,41 „	29,94 „	24,18 „	30,393 „
	Zu- (+) bzw. Abnahme (-) In Prozenten	-15,84 g - 4,46 %	- 2,82 g - 1,21 %	- 24,67 g - 13,34 %	— —	-1,73 g - 4,44 %	— —	— —	— —	— —	-21,24 g - 50,70 %	- 2,56 g - 9,56 %	- 0,72 g - 2,35 %	± 0 ± 0	- 0,367 g - 1,19 %
2	Erbsenmehl:														
	Vor dem Versuch	354,68 g	198,92 g	198,80 g	—	31,44 g	—	—	—	—	64,97 g	23,89 g	20,69 g	16,77 g	31,507 g
	Nach dem Versuch	338,10 „	191,37 „	159,86 „	1,944 g	28,50 „	20,51 g	15,42 g	1,288 g	2,051 g	48,25 „	17,78 „	20,02 „	16,77 „	30,618 „
	Zu- (+) bzw. Abnahme (-) In Prozenten	- 16,58 g - 4,67 %	- 5,55 g - 2,82 %	- 38,94 g - 17,51 %	— —	- 2,94 g - 9,35 %	— —	— —	— —	— —	- 16,72 g - 25,73 %	- 6,11 g - 25,58 %	+ 0,67 g + 3,24 %	± 0 ± 0	- 0,880 g - 2,82 %
3	Sesammehl:														
	Vor dem Versuch	358,72 g	153,12 g	146,08 g	—	45,02 g	—	—	—	—	74,17 g	15,59 g	21,26 g	43,66 g	24,499 g
	Nach dem Versuch	341,94 „	150,66 „	89,38 „	2,346 g	48,49 „	39,46 g	15,08 g	1,036 g	1,946 g	50,88 „	8,48 „	19,70 „	48,66 „	24,105 „
	Zu- (+) bzw. Abnahme (-) In Prozenten	- 16,78 g - 4,68 %	- 2,46 g - 1,61 %	- 56,70 g - 38,81 %	— —	+ 3,57 g + 7,77 %	— —	— —	— —	— —	- 23,29 g - 31,40 %	- 7,11 g - 45,61 %	- 1,56 g - 7,34 %	± 0 ± 0	- 0,394 g - 1,10 %
4	Rübsenmehl:														
	Vor dem Versuch	317,21 g	121,10 g	109,49 g	—	28,01 g	—	—	—	—	61,62 g	25,91 g	47,24 g	33,33 g	19,376 g
	Nach dem Versuch	310,60 „	120,36 „	91,38 „	1,087 g	25,69 „	17,67 g	8,98 g	0,621 g	0,500 g	54,82 „	22,21 „	45,22 „	33,33 „	19,257 „
	Zu (+) bzw. Abnahme (-) In Prozenten	- 6,61 g - 2,84 %	- 0,74 g - 0,61 %	- 18,11 g - 16,54 %	— —	- 2,32 g - 8,28 %	— —	— —	— —	— —	- 6,80 g - 11,03 %	- 3,70 g - 14,28 %	- 2,02 g - 4,28 %	± 0 ± 0	- 0,119 g - 0,61 %

5

Rapsmehl:

Vor dem Versuch	351,52 g	124,41 g	106,52 g	—	32,12 g	—	—	—	81,39 g	29,03 g	52,49 g	32,08 g	19,906 g
Nach dem Versuch	330,70 „	123,02 „	100,63 „	1,230 g	27,18 „	—	—	—	62,27 „	25,36 „	49,24 „	32,08 „	19,683 „
Zu- (+) bzw. Abnahme (-)	-20,82 g	-1,39 g	-5,89 g	—	-4,94 g	—	—	—	-19,12 g	-8,17 g	-3,25 g	± 0	-0,223 g
In Prozenten	-5,92 %	-1,12 %	-5,53 %	—	-15,38 %	—	—	—	-23,49 %	-10,92 %	-6,19 %	± 0	-1,12 %

Reismehl:

Vor dem Versuch	351,16 g	48,46 g	47,48 g	—	46,11 g	—	—	—	137,14 g	38,97 g	44,70 g	40,78 g	7,753 g
Nach dem Versuch	337,87 „	49,97 „	34,22 „	0,399 g	47,07 „	—	—	—	113,75 „	27,19 „	42,67 „	40,78 „	7,995 „
Zu- (+) bzw. Abnahme (-)	-13,29 g	+1,51 g	-13,26 g	—	+0,96 g	—	—	—	-23,39 g	-6,78 g	-2,03 g	± 0	+0,242 g
In Prozenten	-3,78 %	+3,12 %	-27,93 %	—	+2,08 %	—	—	—	-17,06 %	-13,96 %	-4,54 %	± 0	+3,12 %

Kokosnußmehl:

Vor dem Versuch	171,29 g	39,78 g	40,50 g	—	13,82 g	—	—	—	171,51 g	4,55 g	30,16 g	11,47 g	6,364 g
Nach dem Versuch	147,75 „	44,74g(?)	40,51 „	0,286 g	13,21 „	—	—	—	140,28 „	4,31 „	30,09 „	11,47 „	7,153 „(?)
Zu- (+) bzw. Abnahme (-)	-23,54 g	+4,96 g	+0,01 g	—	-0,61 g	—	—	—	-31,23 g	-0,24 g	-0,07 g	± 0	+0,794 g
In Prozenten	-13,74 %	+12,47 %	± 0	—	-4,41 %	—	—	—	-43,67 %	-5,27 %	0,0	± 0	+12,47 %

Palmkernmehl:

Vor dem Versuch	239,08 g	48,02 g	50,98 g	—	21,99 g	—	—	—	73,37 g	9,61 g	74,92 g	11,17 g	7,684 g
Nach dem Versuch	223,80 „	51,25 „(?)	45,79 „	0,145 g	20,55 „	—	—	—	59,40 „	11,26 „(?)	66,92 „	11,17 „	8,200 „(?)
Zu- (+) bzw. Abnahme (-)	-15,28 g	+3,23 g	-5,19 g	—	-1,44 g	—	—	—	-13,97 g	+1,65 g	-8,0 „ g	± 0	-0,516 g
In Prozenten	-6,40 %	+6,73 %	-10,18 %	—	-6,55 %	—	—	—	-19,04 %	+14,17 %	-10,68 %	± 0	+6,71 %

Palminußmehl:

Vor dem Versuch	300,27 g	56,78 g	56,78 g	—	23,06 g	—	—	—	123,79 g	17,53 g	63,22 g	15,89 g	9,085 g
Nach dem Versuch	283,71 „	59,02 „(?)	56,04 „	0,162 g	20,85 „	—	—	—	102,61 „	15,46 „	66,28 „	15,89 „	9,444 „(?)
Zu- (+) bzw. Abnahme (-)	-16,56 g	+2,24 g	-0,74 g	—	-2,21 g	—	—	—	-21,18 g	-2,07 g	+3,06 g	± 0	+0,359 g
In Prozenten	-5,52 %	+3,95 %	-1,30 %	—	-9,58 %	—	—	—	-17,11 %	-11,81 %	+4,84 %	± 0	+3,95 %

Leinmehl:

Vor dem Versuch	331,75 g	142,46 g	131,19 g	—	16,64 g	—	—	—	69,15 g	41,50 g	43,15 g	19,85 g	22,793 g
Nach dem Versuch	321,11 „	141,77 „	103,87 „	0,633 g	16,02 „	—	—	—	47,71 „	36,22 „	48,36 „(?)	19,85 „	22,683 „
Zu- (+) bzw. Abnahme (-)	-10,64 g	-0,69 g	-25,32 g	—	-0,62 g	—	—	—	-20,44 g	-5,28 g	+5,21 g	± 0	-0,110 g
In Prozenten	-3,21 %	-0,48 %	-19,30 %	—	-3,73 %	—	—	—	-29,99 %	-12,72 %	+12,07 %	± 0	-0,47 %

10

Zweite Versuchsreihe.

Freiwillige Zersetzung von Futtermitteln unter Mitwirkung der obligat anaëroben, Protein zersetzenden Bakterien.

Für diese Untersuchung wurden Lein-, Sesam-, Erdnuß- und Kokosnußmehl 9 bzw. letzteres 11 Monate lang in dünner Schicht von etwa 5 cm Dicke faulen gelassen, wobei monatelang die Flora im Innern fast lediglich aus Anaërobiern und in den äußeren Schichten aus Kartoffelbacillen bestand. Die Schimmelschicht war, nachdem die Rinde alkalisch geworden, verschwunden.

Die Untersuchungsergebnisse sind in den Tabellen IV und V zusammengestellt.

Tabelle IV.

Zusammensetzung und Umsetzung der bei Luftzutritt 9 Monate lang gefaulten Mehle.

A. Prozentuale Zusammensetzung der Trockensubstanz:

No.	Bezeichnung	Trockensubstanz %	Rohprotein %	Reinprotein %	Ätherextrakt %	Stickstofffreie Extraktstoffe %	Pentose %	Rohfaser %	Asche %	Gesamtstickstoff %
1	Leinmehl	—	39,09	27,36	7,04	8,83	11,78	23,12	10,14	6,24
2	Sesammehl	—	53,54	23,93	22,49	11,52	2,24	9,27	20,94	5,37
3	Erdnußmehl	—	48,97	35,97	14,89	10,61	5,33	11,73	8,47	7,83

B. Absolute Mengen vor¹⁾ und nach²⁾ dem Versuch:

Leinmehl:										
	Vor dem Versuch . . .	100,00 g	42,85 g	39,53 g	5,02 g	20,63 g	12,51 g	13,01 g	5,98 g	6,85 g
	Nach dem Versuch . . .	58,97 „	23,05 „	16,14 „	4,15 „	5,21 „	6,95 „	13,63 g ?	5,98 „	3,69 „
	Zu-(+)-bzw. Abnahme (-)	-41,03 g	-19,80 g	-23,39 g	-0,87 g	-15,42 g	-5,56 g	+0,62 g	± 0	-3,16 g
	In Prozenten	-41,03 %	-46,21 %	-59,17 %	-17,33 %	-74,75 %	-44,44 %	+4,77 %	± 0	-46,21 %
Sesammehl:										
	Vor dem Versuch . . .	100,00 g	42,52 g	40,72 g	12,80 g	20,84 g	4,35 g	5,93 g	13,56 g	6,80 g
	Nach dem Versuch . . .	64,96 „	21,80 „	15,55 „	14,62 „	7,49 „	1,46 „	6,03 „	13,56 „	3,50 „
	Zu-(+)-bzw. Abnahme (-)	-35,04 g	-20,72 g	-25,17 g	+1,82 g	-13,35 g	-2,89 g	+0,10 g	± 0	-3,30 g
	In Prozenten	-35,04 %	-48,53 %	-61,81 %	+14,22 %	-64,06 %	-66,44 %	+1,69 %	± 0	-48,53 %
Erdnußmehl:										
	Vor dem Versuch . . .	100,00 g	55,52 g	54,64 g	8,86 g	18,33 g	6,73 g	5,83 g	4,73 g	8,89 g
	Nach dem Versuch . . .	55,98 „	27,42 „	20,14 „	8,34 „	5,94 „	2,98 „	6,57 g (?)	4,73 „	4,39 „
	Zu-(+)-bzw. Abnahme (-)	-44,02 g	-28,10 g	-34,50 g	-0,52 g	-12,39 g	-3,75 g	+0,74 g	± 0	-4,50 g
	In Prozenten	-44,02 %	-50,61 %	-63,14 %	-5,87 %	-67,60 %	-55,72 %	+12,69 %	± 0	-50,61 %

¹⁾ Berechnet nach Tabelle I (S. 188) auf 100 g Trockensubstanz.

²⁾ Berechnet nach obigen Zahlen unter Voraussetzung eines unveränderten Aschengehaltes.

Tabelle V.

Zusammensetzung und Umsetzung des bei Luftzutritt 11 Monate lang
gefaulten Kokosnußmehles vor und nach dem Versuche.

A. Prozentuale Zusammensetzung der Trockensubstanz:

Kokosnußmehl	Ge- samte feuchte Masse	Trok- kensub- stanz	Roh- protein	Rein- protein	Äther- extrakt	Stick- stoff- freieEx- trakt- stoffe	Roh- faser	Pento- sane	Asche
Vor dem Versuch .	—	41,40 %	23,64 %	23,22 %	8,07 %	41,33 %	17,61 %	2,66 %	6,69 %
Nach dem Versuch .	—	15,84 „	21,74 „	19,04 „	13,75 „	36,38 %	—	5,96 „	21,87 „

B. Absolute Mengen vor und nach dem Versuch:

Vor dem Versuch .	4400 g	1821,0 g	430,48 g	422,83 g	146,95 g	1077,30 g	48,44 g	121,82 g
Nach dem Versuch .	3375 „	534,7 „	116,24 „	101,81 „	73,52 „	193,13 „	31,87 „	116,94 „
Zu- (+) bzw. Ab- nahme (—)	—10,5 g	—1286,3 g	—314,24 g	—321,02 g	—73,43 g	—881,17 g	—16,57 g	—4,88 g
In Prozenten . . .	—23,27%	—70,69%	—73,00%	—75,92%	—49,97%	—81,80%	—34,21%	—4,01%

Aus den Tabellen IV und V geht hervor, daß unter der vereinigten Wirkung dieser beiden proteinzersetzenden Bakteriengruppen bis zu 70% der Trockenmasse verschwunden waren. Den Hauptverlust erlitten auch in diesem Falle die stickstofffreien Extraktstoffe, die bis 90% ihrer Menge einbüßten. Ebenso nahmen die Pentosane erheblich ab, während Rohfaser und Fett bei Lein-, Sesam- und Erdnußmehl keine Einbuße erlitten hatten. Deshalb wurde die Rohfaserbestimmung bei Kokosnußmehl nicht ausgeführt, zumal da gerade bei diesem Mehle gut übereinstimmende Ergebnisse kaum erzielt wurden; es wurden hier vielmehr Rohfaser und stickstofffreie Extraktstoffe aus der Differenz berechnet. Die starke Abnahme des Ätherextraktes beim Kokosnußmehl erklärt sich vielleicht so, daß das Fett zum großen Teil gespalten und die Säuren durch das gebildete Ammoniak in ätherunlösliche Salze übergeführt worden waren. Sehr stark war bei allen Mehlen der Rückgang des Reinproteins, der bis über 70% betrug. Eine starke Einbuße hatte auch der Gesamtstickstoff erlitten, hauptsächlich wohl durch Ammoniakverdunstung.

Dritte Versuchsreihe.

Zersetzung von sterilisiertem Baumwollsaatmehl durch *Bacillus putrificus*.

Um die Einwirkung des *Bacillus putrificus*, der, wie aus dem bakteriologischen Teile hervorgeht, der hauptsächlichste anaërobe Proteinzersetzer in den untersuchten Futter-

mehlen ist, auch für sich auf eines der Futtermittel kennen zu lernen, wurde er in sterilisiertes Baumwollsaatmehl geimpft und dieses in einer durch Pyrogallussäure von Sauerstoff befreiten Atmosphäre gehalten. Die Aufarbeitung der Probe erfolgte nach acht Wochen. Die Probe war nach dieser Zeit äußerlich unverändert, reagierte und roch sauer und etwas aromatisch, aber nicht faul. Die bakteriologische Untersuchung ergab die Anwesenheit des *Bacillus putrificus* in Reinkultur. Über die stattgehabte Zersetzung geben die folgenden Übersichten Aufklärung:

A. Prozentuale Zusammensetzung des sterilisierten Baumwollsaatmehles vor und nach dem Versuche.

Bezeichnung	Wasser	Rohprotein	Reinprotein	Ätherextrakt	Freie Fettsäure (Ölsäure)	Stickstofffreie Extraktstoffe	Pentose	Rohfaser	Asche	Gesamtstickstoff
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
a) Natürliche Substanz:										
Vor dem Versuch	57,14	23,45	22,03	4,31	0,70	5,59	3,23	3,36	2,90	3,75
Nach dem Versuch	56,75	23,31	15,64	5,55	4,67	3,84	3,41	4,08	3,06	3,73
b) Trockensubstanz:										
Vor dem Versuch	—	54,76	51,44	10,06	1,64	12,95	7,60	7,85	6,78	8,76
Nach dem Versuch	—	53,75	36,04	12,79	10,77	9,13	7,87	9,41	7,05	8,60

B. Absolute Mengen vor und nach dem Versuch.

Bezeichnung	Gesamte fenchte Masse	Gesamte Trockensubstanz	Rohprotein	Reinprotein	Ätherextrakt	Freie Fettsäuren (Ölsäure)	Stickstofffreie Extraktstoffe	Pentose	Rohfaser	Asche	Gesamtstickstoff
	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g
Vor dem Versuch	700,0	300,0	164,15	154,21	30,17	4,90	39,11	22,75	23,52	20,30	26,26
Nach dem Versuch	677,0	292,8	157,81	105,88	37,57	31,62	25,99	23,09	27,62	20,72	25,25
Zu — (+) bzw. Abnahme (—) . . .	—23,0	—7,2	—6,34	—48,33	+7,40	+26,72	—13,12	+0,34	+4,10	+0,42	—1,01
In Prozenten . . .	—3,29	—2,40	—3,83	—3,13	+24,53	+545,31	—33,55	+1,50	+17,42	+2,07	—3,85

Die Zahlen zeigen, daß auffallenderweise *Bacillus putrificus* die Proteinstoffe nicht oder kaum verändert, sondern nur eine stärkere Abnahme der stickstofffreien Extraktstoffe bewirkt hat. Im Zusammenhang mit der sauren Reaktion muß man infolge der starken Zunahme des Ätherextraktes und der freien Säuren annehmen, daß lediglich eine Vergärung des Zuckers vor sich gegangen ist und daß unter den gewählten Versuchsbedingungen *Bacillus putrificus* überhaupt keine, oder doch keine wesentliche Verände-

rung der Proteinstoffe herbeizuführen vermag. Diese Annahme haben wir durch Versuche mit Eiereiweiß bei Gegenwart von Zuckern bestätigen können, bei denen sich aber zeigte, daß auch die Art des Zuckers von ausschlaggebender Bedeutung ist. Röhren mit Bouillon und 3 %-igem Peptonwasser in hoher Schicht wurden ohne und mit Zusatz von 2 % und 5 % Glykose, Fruktose, Galaktose, Saccharose, Maltose, Laktose, Mannit und Glycerin sterilisiert, mit *Bacillus putrificus* aus gefaultem Baumwollsaatmehl und dem Stamme der Sammlung Král geimpft und in einer Wasserstoffatmosphäre, bzw. mit einer sterilisierten Ölschicht bedeckt, bei 34° stehen gelassen. Jedes Röhren enthielt einen Würfel gekochtes Eialbumin. Außer in der Glycerinlösung wuchsen die Bakterien überall; die Einwirkung war aber ganz verschieden. In den Lösungen ohne Zucker, sowie in denen mit Saccharose und Mannit war das Eiweiß nach kurzer Zeit verschwunden. Die Lösungen reagierten alkalisch und zeigten starken Fäulnisgeruch. In den Laktoselösungen war das Eiweiß nach mehreren Wochen zwar nicht ganz verschwunden, aber stark vermindert. Die Reaktion war neutral bis schwach alkalisch. In allen anderen Lösungen blieb das Eiweiß äußerlich unverändert; die Reaktion war in ihnen stark sauer; Fäulnisgeruch fehlte. Die starke Gasentwicklung zu Anfang und der dicke Bodensatz von Bakterien, der hier, wie in den alkalischen Lösungen eine Unmenge Sporangien aufwies, zeigten, daß eine Vermehrung der Bakterien stattgefunden hatte. Es scheint also, daß *Bacillus putrificus* gegenüber verschiedenen Zuckerarten ein verschiedenes Gärvermögen besitzt, und daß es von ihnen abhängt, ob er gleichzeitig gebotene Proteinstoffe zersetzt. Daß die Laktose nicht hemmend wirkt, zeigt auch das Verhalten der Bakterien in Milch, die von ihnen unter fast völliger Lösung des Kaseins zu einer stinkenden, durchsichtigen, gelben Flüssigkeit zersetzt wird.

Die hemmende Wirkung der Zuckerarten muß höchst wahrscheinlich auf die Entstehung von Gärungssäuren zurückgeführt werden, die die Wirkung des Trypsins abschwächen, vielleicht auch seine Ausscheidung später ganz verhindern. Eine Abscheidung von proteolytischen Enzymen findet auch bei Gegenwart von gärfähigem Zucker statt, wie der folgende Versuch beweist. Kölbchen mit je 50 ccm Nährlösung (1 Teil Bouillon, 3 Teile Wasser, 0,1 % primäres Kaliumphosphat, 0,05 % Magnesiumsulfat mit Soda neutralisiert), 15 g gekochtes, gehacktes Hühnereiweiß, ohne und mit 1/2, 1, 2 und 5 % Glykose wurden mit *Bacillus putrificus* geimpft und bei 34° in einer Wasserstoffatmosphäre vierzehn Tage lang stehen gelassen. Nach dieser Zeit ergab sich folgendes Bild:

Zuckergehalt	Reaktion	Geruch	Verhalten des Eiweißes
0	stark alkalisch	faulig	ganz zersetzt
0,5 %	schwach alkalisch	„	fast ganz zersetzt
1 „	neutral bis schwach sauer	—	stark zersetzt
2 „	sauer	—	} nicht merklich zersetzt
5 „	„	—	

Die chemische Analyse ergab folgende Mengen gelösten und nicht gelösten Stickstoffes:

	Zuckergehalt:					ungeimpft
	0	0,5 ‰	1 ‰	2 ‰	5 ‰	
Gelöster Stickstoff . .	0,275 g	0,215 g	0,176 g	0,129 g	0,106 g	0,047 g
Stickstoff im Rückstande	0,019 „	0,061 „	0,094 „	0,133 „	0,173 „	0,247 „
	0,294 g	0,276 g	0,270 g	0,267 g	0,279 g	0,294 g
	oder in Prozenten					
Gelöster Stickstoff . . .	93,5 ‰	77,9 ‰	65,2 ‰	48,4 ‰	38,0 ‰	16,0 ‰
Stickstoff im Rückstande	6,5 „	22,1 „	34,8 „	51,6 „	62,0 „	84,0 „

Aus diesem Versuche geht klar hervor, daß auch die Anwesenheit eines gärfähigen Zuckers in kleinen Mengen die Abscheidung von proteolytischem Enzym nicht verhindert, und daß Zuckergärung und Proteinzerersetzung gleichzeitig verlaufen können, daß letztere aber schon durch einen Zusatz von 2 ‰ Glykose sehr verlangsamt wird. Daß die entstehende Säure und nicht etwa die höhere Konzentration der Zuckerlösung auf Ausscheidung und Wirkung des proteolytischen Enzyms hemmend wirkt, hätte am besten durch Neutralisierung der Gärungssäuren festgestellt werden können. Es ist uns aber nicht gelungen, durch Zusatz von Kohlensaurem Kalk zu den Nährlösungen die Neutralisierung der Säuren zu erzielen, da der Kohlensaure Kalk sich mit einer schleimigen Masse überzieht und nicht mehr verteilt werden kann. Neutralisierung durch Vergärung von Harnstoff durch den *Bacillus putrificus*, wie sie Tissier und Martelly¹⁾ bei ähnlichen Versuchen angewendet haben, ist uns nicht gelungen, da unsere Kulturen in harnstoffhaltigen Lösungen nicht wuchsen.

Aus diesen Versuchen erklärt sich auch das Verhalten des *Bacillus putrificus* gegen sterilisiertes Baumwollsaatmehl unter der Annahme, daß die in ihm enthaltene Raffinose (Gossypose), die jedenfalls durch das mehrmalige Sterilisieren unter Druck auch wenigstens teilweise hydrolisiert worden war, dem *Bacillus* wohl ihre Vergärung, nicht aber die Zersetzung der Proteinstoffe gestattete, besonders da ihre Menge den Zuckergehalt der angewendeten Nährlösungen erheblich übersteigt.

Unter den verschiedenen aus den faulen Futtermitteln gezüchteten Stämmen des *Bacillus putrificus* haben wir keinen gefunden, der sich gegen Zucker anders verhalten hätte. Natürlich ist es nicht ausgeschlossen, daß auch Stämme vorkommen können, deren Gärvermögen so gering ist, daß sie auch in stark zuckerhaltigen Nährböden die Proteinstoffe wesentlich zu zersetzen vermögen. Diese würden dann auch sterilisiertes Baumwollsaatmehl zersetzen können.

Um zu zeigen, daß auch bei der freiwilligen Zersetzung unter Luftabschluß in der Tat nur die bei der Vergärung der Kohlenhydrate durch die Kokken und Stäbchenbakterien entstehenden Säuren die Entwicklung des *Bacillus putrificus* hemmen, wurden verschiedene Futtermittel unter Zusatz erheblicher Mengen von Kohlensaurem Kalk acht Monate unter Luftabschluß faulen gelassen. Es zeigte sich aber auch hier, daß trotz dieser Maßregel die Säure nicht immer völlig neutralisiert wird. Das verwendete Reismehl war noch sauer, Baumwollsaat-, Lein- und Kokosnußmehl eben neutral. Obligate Anaerobier waren nicht zur Entwicklung gekommen, sondern nur Kokken und Stäbchen der Koli-Gruppe. Nur das Kokosnußmehl enthielt Buttersäurebakterien. Eine stinkende Fäulnis war nicht eingetreten, doch zeigte das Reinprotein eine viel stärkere Zersetzung als bei den früheren Versuchen ohne Zusatz von Kohlensaurem Kalk, wie aus nachstehender Tabelle hervorgeht:

¹⁾ Ann. Institut. Pasteur 1902, 16, 865.

No.	Bezeichnung des Mehles	In Prozenten:			In absoluten Mengen (Gramm):			
		Trockensubstanz	Rohprotein in der Trockensubstanz des Mehles	Rein-	Gesamt-Masse	Trockensubstanz	Rohprotein	Reinprotein
1	Baumwollsaatmehl:				Mehl 300	270,9		
					Kohlens.Kalk 75	75		
					Wasser 300	—		
	Vor dem Versuch ¹⁾	90,20	54,20	52,12	675	345,9	146,8 g	141,2 g
	Nach dem Versuch	57,67	46,00	40,81	451	260,1	119,6 „	106,1 „
					Abnahme (—)	—27,2 g	—35,1 g	
					In Prozenten	—18,52 %	—24,86 %	
2	Reismehl:				Mehl 300	269,2		
					Kohlens.Kalk 75	75		
					Wasser 300	—		
	Vor dem Versuch ¹⁾	89,72	13,80	13,52	675	344,2	37,1 g	36,4 g
	Nach dem Versuch	61,71	10,46	7,81	474	292,5	30,6 „	22,8 „
					Abnahme (—)	—6,5 g	—13,6 g	
					In Prozenten	—17,52 %	—37,36 %	
3	Leinmehl:				Mehl 300	270,3		
					Kohlens.Kalk 75	75		
					Wasser 450	—		
	Vor dem Versuch ¹⁾	90,10	42,85	39,53	825	345,3	115,8 g	106,9 g
	Nach dem Versuch	42,66	34,69	25,92	722	308,0	106,8 „	79,8 „
					Abnahme (—)	—9,0 g	—27,1 g	
					In Prozenten	—7,77 %	—25,53 %	
4	Kokosnußmehl:				Mehl 300	264,1		
					Kohlens.Kalk 75	75		
					Wasser 550	—		
	Vor dem Versuch ¹⁾	88,02	23,64	23,22	925	339,1	62,4 g	61,3 g
	Nach dem Versuch	37,03	18,95	16,04	655	242,6	46,0 „	39,0 „
					Abnahme (—)	—16,4 g	—22,3 g	
					In Prozenten	—26,28 %	—36,38 %	

Die chemischen Untersuchungen der zersetzten Futtermittel haben also folgendes Endergebnis geliefert:

1. Die freiwillige Zersetzung der untersuchten Kraftfuttermittel verläuft qualitativ bei Abschluß und Zutritt des Sauerstoffes in derselben Richtung, unterscheidet sich quantitativ aber erheblich.

2. Der Verlust an Trockenmasse ist bei Luftabschluß sehr gering, bei Luftzutritt bei gleicher Dauer sehr erheblich.

3. Den Hauptanteil an dem Verlust tragen in beiden Fällen die stickstofffreien Extraktstoffe. Die Pentosane werden besonders bei Luftzutritt ebenfalls stark ver-

¹⁾ Vergleiche Tabelle I (S. 188).

mindert, weniger bei Luftabschluß. Die Rohfaser bleibt im wesentlichen unverändert, ebenso meist der Ätherextrakt.

4. Der Gesamt-Stickstoff erleidet merkliche Einbuße nur bei Luftzutritt. Das Reinprotein wird bei Luftabschluß nur in geringem Umfange, bei Luftzutritt zum größten Teil zu einfacheren Stickstoffverbindungen bis zu Ammoniak abgebaut.

5. Die Reaktion der zersetzten Futtermittel ist bei Luftabschluß stets stark sauer, ebenso der Geruch; bei Luftzutritt ist die Reaktion stark alkalisch, der Geruch widerlich faul. Farbe und Struktur bleiben bei Luftabschluß unverändert, gehen dagegen bei Luftzutritt völlig verloren.

B. Untersuchungen über die Zersetzung von Proteinstoffen durch den aus gefaultem Baumwollsaatmehl gezüchteten *Bacillus putrificus*¹⁾.

Diese Untersuchungen wurden mit Blutfibrin und Eiereiweiß angestellt.

a) Blutfibrin. Das Blutfibrin von der Firma E. Merck enthielt: 8,10% Wasser, 90,72% Stickstoff-Substanz und 1,18% Mineralstoffe.

Von dem grobzerkleinerten Blutfibrin wurde $\frac{1}{2}$ kg in einem geräumigen Erlenmeyer-Kolben mit Wasser und 25 ccm Fleischbrühe überschichtet und mit aufgesetztem Wattepfropfen viermal $\frac{1}{2}$ Stunde bei 125° im Autoklaven sterilisiert. Nach jeder Sterilisation wurde der Kolben 1—2 Tage bei Bruttemperatur stehen gelassen, um etwa noch vorhandene Sporen zur Entwicklung zu bringen und dann durch die folgende Sterilisation sicherer abzutöten. Darauf wurde der Inhalt des Kolbens vorsichtig mit sterilisiertem Öl überschichtet, um auf diese einfache Weise einen luftdichten Abschluß herzustellen; dann wurde im Dampftopf bei 100° aufgekocht. Auf gleiche Weise wurde noch ein zweiter Kolben mit $\frac{1}{2}$ kg Blutfibrin hergerichtet; dieses wurde aber vorher fein gemahlen, um dadurch vielleicht eine stärkere Einwirkung des *Bacillus* zu erreichen.

Beide Kolben wurden mit dem aus dem gefaulten Baumwollsaatmehl gezüchteten Stamme des *Bacillus putrificus* geimpft und im Thermostaten bei 30—35° faulen gelassen. Schon nach 48 Stunden entwickelten sich starke Gasblasen von äußerst unangenehmem Geruch, die mehrmals im Tage durch schwaches Neigen und Rollen der Kolben entfernt wurden. Nach 5 Wochen wurde der Inhalt beider Kolben aufgearbeitet.

Das Öl wurde durch Auffüllen der Kolben mit sterilisiertem Wasser bis zum Überfließen des Öles entfernt, die letzten Spuren wurden mit Filtrierpapier abgetupft.

Das Blutfibrin war stark zersetzt, doch war noch ein ziemlich bedeutender braunschwarzer unzersetzter Rest verblieben; die überstehende Flüssigkeit roch äußerst unangenehm und reagierte schwach alkalisch. Ein mikroskopisches Präparat zeigte ein einheitliches Bild von vielen Sporen und wenigen Stäbchen beim ersten Kolben, sowie von vielen Stäbchen, aber weniger Sporen beim zweiten Kolben, der mit dem feingemahlenen Blutfibrin beschickt war. Von dem Inhalte beider Kolben wurden auch aërobe Gelatine- und Agarkulturen angelegt, die aber kein Wachstum zeigten, während in einer anaëroben Kultur in hoher Schicht (Hochkultur) der *Bacillus putrificus* sich stark entwickelte.

¹⁾ Vergl. zu diesem Abschnitte: Hoppe-Seyler, Handbuch der physiol. u. patholog. chemischen Analyse 1903, 7. Aufl., und E. Salkowski, Praktikum der physiol. u. patholog. Chemie 1900, 2. Aufl.

Der Inhalt beider Kolben wurde durch ein Koliertuch gegeben, der Rückstand mit Wasser ausgewaschen, wieder in zwei Kolben verteilt, mit Wasser und etwas Fleischbrühe versetzt, sterilisiert und geimpft. Doch trat diesmal keine bemerkenswerte Gasbildung ein, ein Zeichen, daß die Fäulnis beim ersten Male einen Endzustand erreicht hatte, weshalb die Wiederholung des Versuches nicht weiter durchgeführt wurde.

Von der durchkolierten Flüssigkeit wurden 100 cem von Weizenkleie aufsaugen gelassen, der üble Geruch im Exsikkator über mit Kupfersulfat getränkten Bimssteinstücken entfernt und dann an ein Kaninchen verfüttert. Es sollte dadurch festgestellt werden, ob nicht bei dieser starken Fäulnis sich giftige Stoffe gebildet hatten; doch war nach dem Verfüttern bei dem Kaninchen keinerlei schädliche Wirkung wahrzunehmen.

Der Rest der schwach alkalischen Flüssigkeit wurde noch mit 20 g Kohlensäurem Natron versetzt, um alle Säuren sicher zu neutralisieren, und dann destilliert. Das zuerst übergehende Destillat wurde zum Nachweise von Merkaptan in einer 3/o-igen Lösung von Quecksilbercyanid aufgefangen. Der Niederschlag von Schwefelquecksilber und etwa gebildetem Merkaptanquecksilber wurde mit Salzsäure behandelt, worin sich letzteres löst, und die abfiltrierte Lösung in eine 3/o-ige Lösung von Bleiacetat destilliert. Es bildete sich an der Eintrittsstelle des Destillates ein schwaches gelbliches Häutchen, das sich beim Schütteln auflöste. Beim Verdunsten der Bleiacetatlösung hinterblieben neben rein weißen Krystallen von Bleiacetat wenige gelbliche Kryställchen, sodaß wenigstens Spuren von Methylmerkaptan als vorhanden angenommen werden können.

Das übrige Destillat der Fäulnisflüssigkeit wurde vorsichtig mit Schwefelsäure angesäuert und dann dreimal mit Äther ausgeschüttelt. Die wässrige Lösung wurde nicht weiter untersucht, während die Ätherlösung mit Natronlauge kräftig geschüttelt und von dieser getrennt wurde. Beim Abdunsten des Äthers zersprang leider der Kolben, wodurch der Nachweis des etwa vorhandenen Indols und Skatols unmöglich wurde.

Die Natronlauge wurde mit Schwefelsäure übersättigt, mit Natriumkarbonat wieder alkalisch gemacht, abermals mit Äther ausgeschüttelt und dieser von der wässrigen Lösung (a) getrennt. Beim Verdunsten des Äthers blieb ein ganz geringer Rückstand, der aber weder den eigenartigen Kresolgeruch zeigte, noch eine qualitative Reaktion auf Phenol oder Kresol gab.

Der ursprüngliche alkalische Destillationsrückstand wurde auf dem Wasserbade schwach eingeeengt, mit etwa der zehnfachen Menge 95/o-igem Alkohol gefällt und abfiltriert. Der Rückstand, bestehend aus Eiweiß, Salzen und Bakterien, wurde unberücksichtigt gelassen. Das Filtrat wurde eingedampft, mit Alkohol aufgenommen, der Alkoholauszug mit der vorher erhaltenen wässrigen Lösung (a) vereinigt und bei alkalischer Reaktion eingedampft. Der Rückstand wurde mit Wasser aufgenommen, mit Schwefelsäure stark übersättigt und mehrmals mit Äther ausgeschüttelt.

In der wässrigen Lösung wurden Peptone durch die Biuretreaktion nachgewiesen. Der Ätherauszug wurde abgedunstet, mit verdünnter Natronlauge aufgenommen, mit Baryumchlorid zur Entfernung von Fett gefällt, filtriert, das Filtrat eingeeengt, mit Salzsäure angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt. Beim Verdunsten des Äthers hinterblieb ein schwer bewegliches Öl. Aus diesem wurden die flüchtigen Fettsäuren im Dampfstrom abdestilliert und in Natronlauge aufgefangen. Die Destillation

wurde etwa 25 Stunden fortgesetzt, bis die übergehende Flüssigkeit nicht mehr sauer reagierte.

Die gesamte Destillationsflüssigkeit wurde eingedampft, mit Schwefelsäure übersättigt und mit Äther gut ausgeschüttelt und dieser verdunstet.

Da bei der fraktionierten Destillation des Ätherrückstandes keine konstanten Siedepunkte erzielt werden konnten, wurden die einzelnen nicht scharf getrennten Fraktionen mit sorgfältig gereinigtem und von Chloriden befreitem Calciumkarbonat eingedampft. Die fettsauren Kalksalze wurden in viel kochendem Wasser gelöst und die Filtrate der fraktionierten Krystallisation unterworfen. Die erhaltenen Krystalle wurden im Exsikkator über Phosphorsäureanhydrid, unter gleichzeitigem Evakuieren und Erhitzen auf 70—80°, getrocknet, dann durch Glühen in Calciumoxyd umgewandelt und so ihr Calciumgehalt festgestellt. So wurde bei verschiedenen Krystallfraktionen:

Gefunden	Berechnet für
18,17; 18,22; 18,47 % Ca.	Buttersaures Calcium = 18,72 % Ca.
16,33 „ „	Valeriansaures Calcium = 16,56 „ „
13,92; 15,32 „ „	Kapronsaures Calcium = 14,84 „ „
11,96 „ „	Kaprylsaures Calcium = 12,29 „ „

Phenylessigsäure und Phenylpropionsäure konnten in diesem Dampfstromdestillat nicht nachgewiesen werden.

Der im Destillationskolben verbliebene Rückstand wurde nach längerem Stehen von der abgeschiedenen harzigen Masse abfiltriert, das Filtrat eingengt, wobei es sich violett färbte von einem Farbstoffe, der sich beim Erkalten in schleimiger Form mit dunkel gefärbten Krystallen abschied. Um diesen zu entfernen, wurden die Krystalle wieder gelöst und die Flüssigkeit mit Tierkohle gründlich ausgekocht. Aus dem so entfärbten Filtrate schieden sich nach mehrtägigem Stehen schwach rosa gefärbte Krystalle aus, die den Schmelzpunkt 129° zeigten. Diese wurden in heißem Wasser gelöst und nochmals mit Tierkohle entfärbt, worauf rein weiße Nadeln und Tafeln auskrystallisierten, die den Schmelzpunkt 128° zeigten, der für p-Oxyphenylpropionsäure stimmen würde, für die in der Literatur 125° bzw. 128° als Schmelzpunkt angegeben ist. Auch gab eine Spur der Krystalle, in wenig heißem Wasser gelöst, mit Millons Reagens beim Erwärmen eine sehr starke Rotfärbung. Skatol-essigsäure, deren Schmelzpunkt zu 134° angegeben ist, konnte es nicht sein, da die Krystalle keinen Stickstoff enthielten.

Aus der Mutterlauge dieser ersten Krystallisation wurden noch zwei weitere Körper vom Schmelzpunkt 127° bzw. 124,5° erhalten, worauf noch wenig schmieriges Öl zurückblieb, das auf keine Weise krystallinisch zu erhalten war, jedoch beim Erwärmen mit Millons Reagens noch starke Rotfärbung zeigte. Als Fäulnisserzeugnisse des Blutfibrins wurden durch diesen Versuch also nachgewiesen: neben Schwefelwasserstoff Spuren von Methylmerkaptan; an Fettsäuren: Butter-, Valerian-, Kapron- und Kaprylsäure; ferner p-Oxyphenylpropionsäure.

b) Eier-Albumin. Hiermit wurde die gleiche Untersuchung angestellt. Das gepulverte Eier-Albumin des Handels enthielt 14,13 % Wasser, 76,47 % Stickstoff-Substanz und 4,51 % Mineralstoffe.

400 g dieses Albumins wurden in einem Erlenmeyer-Kolben mit stark verdünnter Bouillon überschichtet und bei 125° im Autoklaven 1/2 Stunde sterilisiert. Da die ganze Masse sich dabei zu käseartiger Konsistenz zusammenballte, so wurde sie in kleine Würfel zerschnitten, in einen sterilisierten Kolben gefüllt, mit

sterilisiertem Öl überschichtet, zweimal im Dampftopf eine Stunde lang aufgekocht und dann ebenfalls mit dem Anaërobier geimpft. Nach 18-tägigem Stehen im Thermostaten war das Eiweiß fast völlig zersetzt, die Reaktion schwach alkalisch, der Geruch sehr unangenehm, hauptsächlich nach Schwefelwasserstoff. Das mikroskopische Präparat zeigte auch hier, wie beim gefaulten Blutfibrin, ein einheitliches Bild mit vielen Sporen und sehr wenigen Vegetationsformen, ein Zeichen, daß die Fäulnis ihr Ende erreicht hatte. Die Untersuchung geschah in gleicher Weise wie beim Blutfibrin. 100 ccm der durchkolierten Flüssigkeit wurden mit Weizenkleie gemischt und an ein Kaninchen verfüttert, auch hier ohne schädlichen Einfluß.

Die erste Ätherlösung des Destillates hinterließ wenige Tropfen Öl, die aber keine Reaktion auf Indol oder Skatol gaben; desgleichen war kein Kresol oder Phenol nachweisbar. Bei der Untersuchung des ursprünglichen Destillates machte sich durch Ansäuern des in Natronlauge aufgefangenen Wasserdampfdestillates mit Schwefelsäure der Geruch nach Essigsäure bemerkbar. Die Trennung der flüchtigen Fettsäuren wurde wieder mittels ihrer Calciumsalze ausgeführt.

Gefunden	Berechnet für	
12,19—12,44 % Ca (5 Bestimmungen)	Kaprylsaures Calcium	12,29 % Ca
14,29 und 15,00 % Ca	Kaprinsaures Calcium	14,84 „ Ca

Die bei der vorher versuchten fraktionierten Destillation zuletzt übergegangenen Tropfen waren über Nacht erstarrt und zeigten den Schmelzpunkt 43 bis 44°, der mit dem für Laurinsäure von 43,6° übereinstimmen würde. Der im Fraktionierkölchen verbliebene geringe Rückstand wurde zur Bestimmung der Phenylessig- bzw. Phenylpropionsäure mit Zinkoxyd und Wasser mehrere Male eingedampft, dann mit viel Wasser abgekocht und filtriert. Aus dem Filtrate schieden sich geringe Mengen nadelförmiger Krystalle aus, von denen ein Teil zu einer Zinkbestimmung benutzt wurde. Diese ergab 16,07 % Zink, während Phenylpropionsaures Zink 18,0 % und Phenylessigsaures Zink 19,5 % Zink verlangt.

Der andere Teil des auskrystallisierten Salzes wurde mit Salzsäure zersetzt und mit Äther ausgeschüttelt. Der Ätherrückstand erstarrte in der Kälte und zeigte den Schmelzpunkt 43°, während für Phenylpropionsäure 48,7° und für Phenylessigsäure 76,5° angegeben sind. Der beim Auskochen mit Wasser verbliebene Rückstand wurde ebenfalls mit Salzsäure zersetzt und mit Äther geschüttelt. Beim Abdunsten des Äthers hinterblieb wenig gelbbraunes Öl, das in der Kälte erstarrte und den Schmelzpunkt 47—48° zeigte. Das Öl wurde mit Wasser und reinstem Calciumkarbonat mehrere Male zur Trockne verdampft, mit Wasser ausgekocht und abfiltriert. Aus dem Filtrate schied sich beim starken Einengen wenig Salz aus, dessen Calciumgehalt zu 12,33 % gefunden wurde. Für Phenylpropionsaures Calcium berechnet sich 11,86 % und für Phenylessigsaures Calcium 12,93 % Ca. Es konnte wegen der zu geringen Menge nicht sicher festgestellt werden, ob ein Gemisch von Phenylpropionsäure mit Phenylessigsäure oder erstere allein vorlag. Aus dem von Harzbestandteilen abfiltrierten Rückstande der Dampfstromdestillation schieden sich beim Einengen schön glänzende Blättchen aus, die, aus heißem Wasser umkrystallisiert, den Schmelzpunkt 133° zeigten, der mit dem für Skatolessigsäure bzw. Indolpropionsäure angegebenen von 134° übereinstimmt. Mit Ferrichlorid gab eine Lösung der Krystalle eine starke Rotfärbung und mit Kaliumnitrat und Essigsäure ein schönes Krystallmagma aus mikroskopisch feinen zu Bündeln vereinigten Nadeln. Aus der Mutterlauge

wurde noch eine zweite Krystallisation von gleichen Eigenschaften gewonnen. Das Filtrat davon wurde mit Äther geschüttelt und die wässrige Lösung auf Bernsteinsäure untersucht, jedoch ohne Erfolg. Aus dem mit heißem Wasser aufgenommenen Ätherrückstand schied sich p-Oxyphenylpropionsäure, mit schleimigem Farbstoff verunreinigt, aus. Nach der Entfärbung der im Wasser gelösten Krystalle mit Tierkohle fielen Krystalle aus, die den Schmelzpunkt 123° zeigten.

Die Mutterlauge gab beim Erwärmen mit Millons Reagens noch starke Rotfärbung und eine zweite Krystallisation vom Schmelzpunkt 120° . Bei diesem Versuche wurden also an Fäulniserzeugnissen aus Eieralbumin gefunden: an Fettsäuren: Essigsäure, Kapron- und Kaprylsäure, Laurinsäure (?), ferner Phenylpropionsäure, Skatolessigsäure bzw. Indolpropionsäure und p-Oxyphenylpropionsäure; zweifelhaft blieb die Anwesenheit von Phenylelessigsäure; dagegen fehlten die einfacheren Fäulniserzeugnisse.

Ein Versuch, die Muttersubstanz der Indolpropionsäure, das Tryptophan, nach dem von Hopkins und Cole¹⁾ angegebenen Verfahren darzustellen, hatte keinen Erfolg. Zu dieser Untersuchung wurden 300 g Blutfibrin auf die angegebene Weise sterilisiert, mit dem Anaërobier geimpft und der Fäulnis überlassen. Sobald nach kurzer Zeit starke Gasentwicklung als Zeichen der begonnenen Fäulnis auftrat, wurde Chloroform zugesetzt, um das Bakterienwachstum zu vernichten, eine zu weit gehende Spaltung zu verhindern und nur die tryptischen Enzyme weiter wirken zu lassen. Nach etwa 3 Wochen zeigte auch diese Probe schwach alkalische Reaktion. Das mikroskopische Präparat war ebenfalls frei von anderen Bakterienformen.

Die ganze Masse wurde nun erst durch Koliertücher, dann durch Faltenfilter filtriert, das Filtrat mit etwa 5% Schwefelsäure versetzt und mit etwa 150 ccm einer 10%-igen Lösung von Quecksilbersulfat in verdünnter Schwefelsäure gefällt. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt, mit 5%-iger Schwefelsäure gewaschen, dann in Wasser verteilt, mit Schwefelwasserstoff in der Wärme zerlegt und abfiltriert. Das durch Erhitzen von Schwefelwasserstoff befreite Filtrat wurde wieder mit Schwefelsäure bis zu 5% versetzt und mit Quecksilbersulfatlösung gefällt, dann abgesaugt, der Rückstand mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat sorgfältig mit heißer Barytlauge gefällt und der Überschuß des Barythydrats durch Einleiten von Kohlensäure ausgefällt. Das Filtrat wurde eingengt und mit Alkohol versetzt. Es fiel eine geringe Menge schleimiger Substanz aus, die in heißem Wasser löslich, aber in 45%-igem Alkohol unlöslich war. Auch gab sie keine Reaktion auf Tryptophan.

Weiterhin wurde nach dem Verfahren von Brieger²⁾ versucht, in gefaultem Blutfibrin Ptomaine nachzuweisen.

Zu dem Zwecke wurden ebenfalls 300 g sterilisiertes Blutfibrin mit dem Anaërobier geimpft und nach etwa drei Wochen aufgearbeitet. Die alkalisch reagierende Masse wurde mit Salzsäure angesäuert und mehrere Tage unter Ersatz des verdampfenden Wassers auf dem Wasserbade digeriert, dann abfiltriert und das Filtrat mit Bleiacetat gefällt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, in Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das gebildete Bleisulfid wurde abfiltriert, das Filtrat eingedampft und mehrmals mit Alkohol ausgezogen. Ein Drittel des Alkoholauszuges wurde eingedampft, in Wasser gelöst und zur Prüfung auf Cholin und Neuridin mit

¹⁾ Journ. of Physiology 1901, 27, 418; 1902, 29, 451; Biochem. Centralbl. 1903, 1, 658.

²⁾ Brieger, Untersuchung über Ptomaine 1885, 2, 53; 3, 13.

Pikrinsäure versetzt; jedoch trat nur eine so geringe Abscheidung ein, daß eine nähere Bestimmung unmöglich war. Die übrigen zwei Drittel des alkoholischen Auszuges wurden mit alkoholischer Quecksilberchloridlösung gefällt, mehrere Tage absetzen gelassen, mit Alkohol ausgewaschen, der Niederschlag mit viel Wasser ausgekocht und abfiltriert. Im Filtrate wurde das Quecksilber mit Schwefelwasserstoff ausgefällt, abfiltriert, das Filtrat eingedampft, mit Alkohol aufgenommen und mit alkoholischer Platinchloridlösung versetzt.

Beim Verdunsten blieben ebenfalls nur wenige Krystalle zurück, die zu einer genaueren Untersuchung nicht ausreichten. Das Filtrat der durch die alkoholische Quecksilberchloridlösung entstandenen Fällung wurde durch Schwefelwasserstoff vom überschüssigen Quecksilberchlorid befreit, das Filtrat hiervon mit Natriumkarbonat neutralisiert und eingedampft, mit Alkohol ausgezogen und dieser Auszug wieder mit alkoholischer Quecksilberchloridlösung versetzt. Nach mehreren Tagen wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert, mit Wasser ausgekocht, die wässrige Lösung durch Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit, das Filtrat mit wässriger Platinchloridlösung versetzt und langsam verdunsten gelassen. Zurück blieben nur wenige Krystalle von Platinchlorid.

Es konnten also keine Ptomaine mit Sicherheit nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen stimmen einerseits mit den von Nencki und Bienstock erhaltenen gut überein, wonach nämlich die obligaten Anaerobier die Proteinstoffe nur bis zu gewissen hochmolekularen Verbindungen abbauen, andererseits ergänzen sie die chemischen Untersuchungen von Wallach über *Bacillus putrificus*.

III. Fütterungsversuche.

Man hat bekanntlich häufig Erkrankungen von ganzen Viehbeständen auf das Verfüttern von Baumwollsaatmehl, besonders amerikanischer Herkunft, zurückgeführt.

Olig hat bereits gelegentlich seiner Untersuchungen Fütterungsversuche mit zersetztem Baumwollsaatmehl angestellt, um festzustellen, ob bei der Fäulnis giftige Stoffe entstehen. Er fütterte Meerschweinchen und Kaninchen kurze Zeit hindurch mit verhältnismäßig geringen Mengen gefaulten Baumwollsaatmehles, beobachtete dabei aber keinerlei Giftwirkung.

Da es möglich ist, daß in dem Verdauungskanal der größeren Haustiere die Vorgänge etwas anders verlaufen, und daß die Giftwirkung erst bei längerer Fütterung durch Akkumulation zustande kommt, haben wir einige Versuche mit Schafen und Ziegen ausgeführt, die wochenlang mit verschiedenen stark gefaulten Mehlen gefüttert wurden.

Versuch I.

4 kg Baumwollsaatmehl wurden in Mengen von je 500 g mit 50 % Wasser angerührt und bei Luftzutritt der Fäulnis überlassen. Die einzelnen Proben wurden in verschiedenen Stufen der Fäulnis innerhalb zweier Tage in vier Gaben an eine Ziege verfüttert.

Zur Fütterung wurde das gefaulte Mehl mit lauwarmem Wasser zu einem dünnen Brei angerührt. Dieser wurde durch einen in den Schlund der Ziege eingeführten Gummischlauch mit aufgesetztem Glastrichter ihr eingegossen.

Vor dem Versuche erhielt die Ziege erst vier Tage lang je $\frac{1}{8}$ kg, dann zwei

Tage lang je $\frac{1}{4}$ kg und ebenso zwischen den zwei Versuchstagen mit faulem Mehle täglich je $\frac{1}{4}$ kg gutes Baumwollsaatmehl.

Der bakterielle und chemische Befund der einzelnen Proben war folgender:

Erste Probe, nach 21-tägiger Fäulnis: Starke Schimmelschicht; Geruch faulig; Reaktion außen alkalisch, innen sauer; anaerobe Hochkultur zeigt kein Wachstum.

Zweite Probe, nach 28-tägiger Fäulnis: Wie vorher nur stärker alkalische Reaktion.

Dritte Probe, nach 35-tägiger Fäulnis: Wie vorher, nur ist die saure Reaktion fast verschwunden.

Vierte Probe, nach 57-tägiger Fäulnis: Reaktion im Innern nur noch ganz schwach sauer; anaerobe Hochkultur zeigt schwaches Wachstum.

Fünfte Probe, nach 64-tägiger Fäulnis: Wie vorher, nur ist das Wachstum der anaeroben Hochkultur stärker.

Sechste Probe, nach 79-tägiger Fäulnis: Reaktion alkalisch; anaerobe Hochkultur zeigt starkes Wachstum.

Siebente Probe, nach 85-tägiger Fäulnis: Es tritt schon freies Ammoniak auf; der Geruch ist äußerst widerlich; die Hochkultur zeigt sehr starkes Wachstum.

Achte Probe, nach 93-tägiger Fäulnis: Wie vorher.

Irgend eine Gesundheitsschädigung der Ziege wurde während des ganzen Versuches nicht beobachtet.

Versuch II.

Bei diesem Versuche wurde ein Hammel längere Zeit mit einem durch Fäulnis an der Luft alkalisch gewordenen Baumwollsaatmehl gefüttert. Um eine möglichst schnelle Abstumpfung der bei der freiwilligen Fäulnis anfangs entstehenden Säuren herbeizuführen, wurde das Mehl öfters gründlich durchgearbeitet, sodaß die oberen alkalischen Teile nach unten gelangten. Nach ungefähr sechs Wochen war die Reaktion in der ganzen Masse schwach alkalisch und eine anaerob angelegte Hochkultur zeigte auch schon schwache Entwicklung. Während der ganzen Dauer des Versuches wurde durch Anlegen solcher Kulturen die sich allmählich steigende Entwicklung von Anaerobiern verfolgt. Die Verfütterung des Mehles erfolgte in gleicher Weise wie bei der Ziege mittels eines Schlauches. Da das widerlich riechende Mehl von dem Tiere nur ungern genommen wurde, wurde, um dieses nicht zu sehr anzustrengen, in kleineren Zwischenräumen die Fütterung auf einen Tag unterbrochen.

Der Hammel erhielt an vier aufeinanderfolgenden Tagen je 100 g des 45 Tage gefaulten Mehles, dann nach einem Tage Unterbrechung vier Tage lang 130 g des 50 Tage gefaulten Mehles und wiederum nach einem Tage Unterbrechung zwei Tage lang 200 g des etwa 65 Tage gefaulten Mehles.

Außer der zeitweilig verminderten Freßlust traten Krankheitserscheinungen bei dem Tiere nicht auf.

Versuch III.

Ein anderer Hammel wurde mit Kokosnußmehl gefüttert, das ebenfalls bis zur völligen alkalischen Reaktion der natürlichen Fäulnis überlassen worden war. Die Versuchsanordnung entsprach ganz der des Versuches II. Auch in diesem Falle wurden nachteilige Folgen nicht beobachtet.

Versuch IV.

Zu diesem Versuche wurde sterilisiertes Baumwollsaatmehl verwendet, das mit drei Stämmen des in freiwillig gefaulten Futtermitteln stets gefundenen *Bacillus putrificus* geimpft und von ihm längere Zeit zersetzt worden war.

Als Versuchstier diente ein Hammel. Er wurde 33 Tage lang mit geimpftem Mehl im Alter von vier bis zu siebenundsechzig Tagen gefüttert.

Die Reaktion des geimpften Mehles war vom Beginn der Fütterung an schwach sauer und diese Reaktion trat später stärker auf.

Eine schädliche Wirkung trat aber auch hier trotz der langen Dauer des Versuchs nicht ein.

Sämtliche Versuche ergaben also, daß auch bei längerer Verfütterung gefaulten Baumwollsaatmehles oder Kokosnußmehles im allgemeinen Gesundheitsschädigungen bei Ziegen und Hammeln nicht einzutreten scheinen.

1905-er Himbeersäfte und -syrupe böhmischer Herkunft.

Von

Adjunkt **R. Kržížan** und Assistent **W. Plahl**.

Mitteilung aus der k. k. Untersuchungsanstalt für Lebensmittel in Prag
(Deutsche Universität). Vorstand: Prof. Dr. F. Hueppe.

Obwohl in der letzten Zeit eine Reihe von Untersuchungen über die Zusammensetzung von Himbeersäften und -syrupe veröffentlicht worden sind, erschien uns doch eine Vermehrung des verhältnismäßig noch spärlich vorhandenen Analysenmaterials als nicht ganz überflüssig, zumal über österreichische Himbeersäfte überhaupt noch fast keine Zahlen vorliegen. Ein endgültiges Urteil über diesen Gegenstand wird ohnehin erst nach jahrelangen, sorgfältig ausgeführten Untersuchungen möglich sein.

A. Beythien¹⁾ führt hinsichtlich der s. Z. von F. Evers²⁾ gefundenen abnorm niedrigen Zahlen an, daß diese Bestimmungen höchstwahrscheinlich mit schwefelhaltigem Leuchtgas ausgeführt worden sind. Diese Erklärung hat etwas für sich und läßt sich nicht ohne weiteres von der Hand weisen.

Das uns in Prag zur Verfügung stehende Leuchtgas ist nun außerordentlich reich an organischen Schwefelverbindungen. Mit diesem Faktor mußte daher gerechnet werden. Der absolute Schwefelgehalt des Prager Leuchtgases ist uns zwar nicht bekannt, er muß jedoch beträchtlich sein, denn sämtliche bei uns im Laboratorium gebrauchten kupfernen Wasserbäder und Trockenschränke zeigen an der Unterseite starke Ausblühungen des im heißen Zustande weiß, nach dem Erkalten aber blaugrün aussehenden wasserfreien Kupfersulfats. Verdampft man Wasser in einer Platinschale über der freien Bunsen-Flamme, so erhält man in der kürzesten Zeit an der Unterseite der Schale stark sauer reagierende Tröpfchen, die nichts anderes sind als verdünnte Schwefelsäure.

Um einen Anhaltspunkt für den Schwefelgehalt unseres Leuchtgases bei der Verwendung im Laboratorium zu gewinnen, führten wir mehrere Versuche aus, von denen wir bloß folgende herausgreifen:

I. 1 g Natriumbikarbonat, das völlig frei von Sulfat war, wurde in einer Weinschale mit ein wenig Wasser angerührt und die Masse behufs Erzielung einer großen Oberfläche durch Schwenken über den Schalenboden ausgebreitet, um ähnliche Verhältnisse zu schaffen, wie sie bei Aschenanalysen vorliegen. Nach dem Eintrocknen auf dem Wasserbade, wurde die

¹⁾ Diese Zeitschrift 1904, 8, 545.

²⁾ Zeitschr. öffentl. Chem. 1904, 10, 319.