

## Die Anaërobiosefrage.

Von

**Br. Lachowicz und M. Nencki.**

---

Hierzu 2 Holzschnitte.

---

Nachdem der Eine von uns durch die im 19. Bande Seite 377 des Journals für praktische Chemie beschriebenen, verschiedenartig modificirten Versuche sich von der Lebensfähigkeit der Spaltpilze bei fehlendem Sauerstoff überzeugt hatte, erwartete er, dass auch der Gegner dieser Ansicht — Herr Professor Gunning in Amsterdam — die Möglichkeit des Lebens ohne freien Sauerstoff anerkennen werde. In einer kürzlich darauf erschienenen Entgegnung erklärte jedoch Gunning<sup>1)</sup>, dass er noch immer auf seiner Meinung beharre, weil er in den meisten von Nencki construirten Apparaten mittelst des von ihm auf Sauerstoff angegebenen Reagens — Bläuung mit Ferrocyankalium getränkter Papierstreifen durch Eisenoxydullösung — das Vorhandensein von Sauerstoff nachweisen konnte. Da es uns aus den früheren Versuchen bekannt war, dass Auskochen der Nährlösung im Wasserstoffstrome hinreichend ist, um allen Sauerstoff aus der Letzteren zu entfernen, derart, dass mit der Nährlösung communicirende alkalische Pyrogallollösung gar nicht gebräunt wird, so haben wir jetzt an dem Prinzipie — den Sauerstoff durch Auskochen zu entfernen — festhaltend, als Prüfstein für die Möglichkeit der Sauerstoffentfernung das Gunning'sche Reagens selbst angewendet. Aus doppeltem

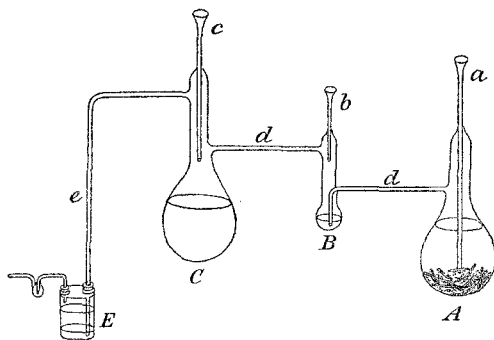
---

1) Journ. f. prakt. Chemie, Bd. 19, p. 434.

Grunde schien es uns geboten das weisse Ferroferrocyanür ( $\text{Fe}_2[\text{FeCy}_6]$ ) zum Nachweise der Sauerstoffabwesenheit in unsern Apparaten zu benutzen. Denn 1) wird von Gunning sein Reagens auf freien Sauerstoff als viel empfindlicher als die meist gebräuchlichen gerühmt, indem in Räumen, in welchen Phosphor nicht mehr leuchtet, mittelst des Ersteren noch Sauerstoff nachgewiesen werden konnte, und 2) war zu erwarten, dass falls mittelst des Ferroferrocyanürs keine Spur von Sauerstoff in unseren Apparaten sich nachweisen liess, auch das letzte Bedenken gegen die Möglichkeit der Anaërobie entkräftet sein wird.

Nach mehreren Vorversuchen, in welchen wir zunächst die Schwierigkeit, vollkommen eisenoxydfreie Reagentien und Gefässe zu erhalten, kennen lernten, haben wir unsern Zweck mittelst folgender Versuchsanordnung erreicht.

Der Apparat besteht aus 3 einzelnen Kolben A, B, C, welche später bei d und d zusammengeschmolzen werden. A und C sind von gleicher Grösse und beiläufig gesagt von 250 cem Inhalt. Der mittlere Kolben B ist kleiner, etwa von 50 cem Inhalt. In A wird Wasserstoff entwickelt aus Eisen und verdünnter Schwefelsäure und so gleichzeitig auch eisenoxydfreies, schwefelsaures Eisenoxydulsalz erzeugt. Desshalb werden in A noch vor dem Einschmelzen des Trichterröhrchens a mehrere Eisenrollen aus nicht zu dünnem Clavierdraht hineingethan. In B befinden sich etwa 10 cem Blutlaugensalzlösung und in C die Nährlösung für die zu cultivirenden Pilze. Die Verbindung der einzelnen Theile des Apparates ist aus der Zeichnung ersichtlich. (Siehe Fig. 1.)



Figur 1.

Die einzelnen Kolben müssen zunächst mit der grössten Sorgfalt gereinigt werden, in der Weise, dass sie anfangs mit Alkalien, hierauf mit eisenoxydfreier, verdünnter Schwefelsäure, sodann mit destillirtem Wasser längere Zeit ausgespült werden. Da es zweckmässig ist,

sofort nach der Reinigung die Kolben zusammenzuschmelzen, muss darauf Bedacht genommen werden, dass die nassen Verbindungsröhrchen mit eisenfreiem Löschpapier getrocknet werden. Nebst der Reinigung des Apparates ist auch bei der Beschickung auf einige Cautelen Rücksicht zu nehmen. Nachdem die Kolben bei d und d' zusammengeschmolzen sind, wird der Kolben A zu etwa  $\frac{2}{3}$  mit destillirtem Wasser gefüllt, mit einigen Tropfen concentrirter Schwefelsäure angesäuert und zum Kochen erhitzt. Während des Siedens hat man Sorge zu tragen durch Schrägstellung des Apparates, dass die im Verbindungsröhrchen zwischen A und B condensirten Dämpfe in den Kolben A zurückfliessen. Es kann sonst leicht geschehen, dass mit den Wasserdämpfen einzelne Eisenoxydtheilchen in das Kölbchen B mit hineingerissen werden. Hat das Wasser einige Minuten gekocht, so lässt man es auf 60–50° erkalten und giesst durch das Trichterröhrchen a von Zeit zu Zeit in kleinen Portionen gut ausgekochte etwa 30–40% Schwefelsäure ein, wodurch ein gleichmässiger, rascher und viele Stunden andauernder Strom von Wasserstoffgas erzeugt wird. Jetzt werden einige frisch auskrystallisirte Krystalle von Ferrocyankalium in ausgekochtem Wasser gelöst und einige cem davon durch das Trichterröhrchen in das Kölbchen B hineingegossen. Während Wasserstoff etwa eine Viertelstunde lang durch die Ferrocyankaliumlösung streicht, wird der Kolben C mit der Nährlösung zu etwa  $\frac{2}{3}$  des Inhalts gefüllt und sodann das Kölbchen B bei b zugeschmolzen. Jetzt wird die Flüssigkeit in dem Kolben C 10–15 Minuten lang im Sieden erhalten, hierauf die Flamme entfernt und noch, während die Flüssigkeit kocht, das Ableitungsrohr e mittelst des in dem Gefässe E befindlichen Quecksilbers abgesperrt. Das Quecksilber in E ist mit einer Schicht von alkalischer Pyrogallolösung bedeckt, welche wiederum, um vor atmosphärischem Sauerstoff geschützt zu sein, mit Olivenöl, ätherischem Oel, einem aromatischen Kohlenwasserstoffe, oder ähnlicher in Wasser unlöslicher Flüssigkeiten überschichtet wird. Jetzt wird das Trichterröhrchen c mit einem Wachspfropfen verschlossen, wodurch das Wasserstoffgas nur durch den Quecksilberverschluss entweichen kann. Ist die Nährlösung in C auf etwa 30° C. abgekühlt, so lüftet man den Wachspfropfen, giesst einige Tropfen (2–5) der Hefe oder bacterienhaltigen Flüssigkeit hinzu, trocknet den Hals bei c mit

Löschpapier und schmilzt zu. Schliesslich bringt man in das Eingussröhrchen (a) etwas Eisendraht, um auch das Röhrchen mit Wasserstoffgas zu füllen und schmilzt bei a zu.

Auf diese Weise geschieht die ganze Beschickung des Apparates im Wasserstoffstrome und die Entwicklung des Gases dauert noch einige Stunden nachdem alle Eingussröhrchen zugeschmolzen sind. Durch Neigung des Apparates wird dann etwas von der Eisenoxydullösung aus A in B hineingegossen. Der jetzt entstandene Niederschlag von Ferroferrocyanür ( $\text{Fe}_2[\text{FeCy}_6]$ ) ist vollkommen weiss und ändert auch nach längerem Stehen seine Farbe nicht.

Wir haben mittelst des so construirten Apparates unsere Erwartung bestätigen können, dass in Räumen, wo das Ferroferrocyanür auch wochenlang vollkommen weiss bleibt, Fäulniss und alkoholische Gährung mit gleichzeitigem Wachsthum und Vermehrung der resp. Pilze stattfinden. Wir wollen die angestellten Versuche einzeln beschreiben.

Am 4. April 1883 wurde in dem oben beschriebenen Apparat ein solcher Versuch ausgeführt. In dem Kolben C befand sich 30% Gelatinelösung und nachdem sie im raschen Wasserstoffstrome auf die Bruttemperatur abgekühlt war, wurde sie mit 4 Tropfen des durch Auspressen eines Ochsenpankreas erhaltenen Drüsensaftes inficirt. Durch Neigen des Kolbens A wurde sodann das Ferrocyankalium mit Eisenoxydulsulfat vermischt. Der entstandene Niederschlag war schneeweiss. Jetzt wurde der Kolben mit der Gelatinelösung in einem Wasserbade, dessen Temperatur mittelst eines Thermoregulators auf  $38^\circ$  eingestellt war, gebracht. Die Wasserstoffentwicklung dauerte noch mehrere Stunden. Am dritten Tage ward die bis dahin noch klare Gelatinelösung deutlich trüb. Am 8. April setzte sich am Boden ein Niederschlag ab, der sich in den folgenden Tagen merklich vermehrte und der, wie die spätere Untersuchung zeigte, nur aus neu gebildeten Spaltpilzen bestand. Während der ganzen Zeit blieb der Niederschlag von Ferroferrocyanür vollkommen weiss. Am 11. April, als der aus Bacterien bestehende Bodensatz sich nicht merklich zu vermehren schien, wurde der Apparat auseinander genommen. Der Inhalt des Kolbens C roch faulig, jedoch nicht nach Indol, ähnlich wie die an der Luft gefaulten Lösungen reiner Gelatine. Mit Salzsäure angesäuert, entwickelte er reichlich Kohlensäure. Der Boden-

satz des Kolbens bestand vorwiegend aus Coccen, dann Köpfchenbakterien und wenigen in Theilung begriffenen Stäbchen. Durch Erhitzen der Nährlösung mit Salzsäure wurden die Spaltpilze zu Flocken zusammengeballt, so dass sie sich gut abfiltriren und auswaschen liessen. Für 7 gr der gelösten Gelatine erhielten wir 0,0998 gr bei 110 getrockneter Bacterien = 0,602 gr frischer Bacterien mit 83,42%<sup>1)</sup> H<sub>2</sub>O.

Am 14. April wurde der gleiche Versuch wiederholt. Als Nährsubstanz diente jetzt wieder 5% Gelatinelösung, welche mit 7 Tropfen frischen Pankreassaftes inficirt war. Eine Stunde nach Zerschmelzen des Trichterröhrchens c wurde das Eisenoxydsulfat mit Ferrocyankalium vermischt und der entstandene Niederschlag blieb während der ganzen Versuchsdauer vollkommen weiss. Am 28. April, also nach 14 Tagen, wurde der Versuch unterbrochen. Die verfaulte, widerlich riechende Flüssigkeit wurde jetzt mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert, wobei sie stark aufbrauste und so lange destillirt, bis im Destillate keine flüchtige Fettsäure nachweisbar war. Die Säuremenge als Essigsäure berechnet betrug hier 29,00% von dem Gewichte der aufgelösten Gelatine.

Am 9. April wurde ein ebensolcher Apparat aufgestellt. In dem Kolben C befand sich als Nährlösung jetzt frische Bierwürze, welche nach dem Auskochen und Abkühlen im Wasserstoffstrom mit 5 Tropfen eines Bodensatzes von eben vergohrener Bierwürze — also mit frischer und junger Hefe — inficirt wird. Der Kolben C befand sich im auf 20—25° temperirten Wasserbade. Der durch Vermischen von Eisensulfat mit Ferrocyankalium entstandene Niederschlag war und blieb auch hier schneeweiss. Schon nach 18 Stunden konnte man in dem Kolben C einzelne Gasblasen emporsteigen sehen und die Hefe setzte sich am Boden des Kolbens ab. Am 11. und 12. war die Flüssigkeit trübe und befand sich in starker Gährung. Es lagerten sich viel grössere Mengen Hefe nach und nach am Boden des Gefässes ab und Kohlensäure entwich durch das Ableitungsrohr e. Hernach klärte sich die Flüssigkeit allmählich und wurde am 15. vollkommen klar. Am 16. wurde der Apparat auseinander genommen, die gebildete Hefe abfiltrirt,

---

1) Vgl. die chemische Zusammensetzung der Fäulnisbakterien von M. Nencki und F. Schaffer. Journ. f. prakt. Chemie (2), Bd. 20, p. 453.

gewaschen, bei 110° getrocknet und gewogen. Für 78 ccm der angewandten Bierwürze erhielten wir 0,0954 gr Hefe = 0,5613 gr frischer Hefe mit 83%  $\text{H}_2\text{O}$ .

Am 24. Mai wurde der Versuch mit Bierwürze wiederholt, welche jetzt mit 3 Tropfen frischer Bierhefe inficirt war. 2 Stunden nach Zuschmelzen des Röhrchens c wurde die Eisenlösung mit Ferrocyankalium vermischt und auch hier blieb der entstandene Niederschlag während des ganzen Versuches vollkommen weiss. Am folgenden Tage stellte sich die Gährung ein, die jedoch nicht so heftig zu sein schien, wie im vorigen Versuche. Nach 3 Tagen klärte sich das Bier und am 30. Mai wurde der Apparat auseinander genommen. Die Flüssigkeit enthielt 2,8 Vol. % Alkohol. Die gleiche Würze aber an der Luft vergäht enthielt nur 2,2 Vol. % Alkohol.

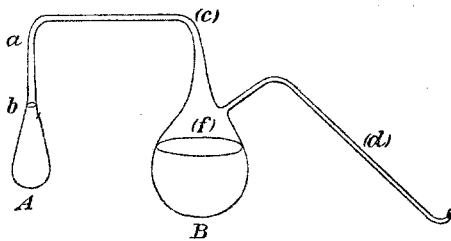
Aus diesen Versuchen geht zunächst soviel hervor, dass durch das Auskochen der Flüssigkeiten und Durchleiten von Wasserstoffgas derart sauerstofffreie Räume hergestellt werden können, dass in ihnen weisses Ferroferrocyanür nicht gebläut wird und sodann, dass in solchen Räumen Fäulniss und alkoholische Gährung ähnlich wie in der Luft ablaufen kann. Wir haben bei diesen Versuchen eine dritte Wahrnehmung gemacht, nämlich die, dass die Herstellung absolut oxydfreier Oxydullösung, sowie die Entfernung jeder Spur Eisenoxyds aus den Apparaten recht schwierig ist. Wir haben absichtlich zu dem Ferrocyankalium weder Alkalibisulfit noch irgend ein anderes Reduktionsmittel zugesetzt, da Spuren in dem Apparate vorhandenen Sauerstoffs von dem überschüssigen Reduktionsmittel absorbirt werden könnten, und so die Blaufärbung des weissen Ferroferrocyanürs verhindern. Gunning<sup>1)</sup> hat übrigens selbst gesehen, als er Wasserstoff längere Zeit durch ein Glasrohr, welches an 2 Stellen nach unten etwas angeblasen war und hier die beiden Flüssigkeiten enthielt, deren Mischung den weissen Niederschlag giebt, hindurchleitete, dass das Präcipitat vollkommen weiss war. Er vermuthet aber, denn bewiesen hat er es nicht, dass in diesem Falle sich hydratisches Schwefeleisen (!) gebildet habe, welches in saurer Flüssigkeit die blaue Verbindung reducirte. Wie die saure Eisenoxydulsulfatlösung hydratisches Schwefeleisen enthalten könnte, ist uns unverständlich. Das wasserhaltige Sesquisulfit  $2(\text{Fe}_2\text{S}_3)$

---

1) Journ. f. prakt. Chemie (2), Bd. 16, p. 121.

$3\text{H}_2\text{O}$  wird von verdünnten Säuren unter Abscheidung von Schwefel gelöst. Unsere Eisensulfatlösung könnte demnach ein solches reducirendes Schwefeleisen nicht enthalten. Beim Auflösen des von uns verwendeten Clavierdrahtes in Schwefelsäure wurden stets geringe Mengen Kohle abgeschieden und ausserdem noch das entweichende Wasserstoffgas etwas nach Arsenwasserstoff. Anfänglich, wo wir den Kolben A etwa nur halb so gross und folglich auch bedeutend weniger Eisen nahmen, ereignete es sich wiederholt, dass die Wasserstoffentwicklung gegen das Ende des Versuches schwächer wurde und dann nach dem Zuschmelzen des Apparates bei c, b und a und Vermischen der Eisensulfatlösung mit Ferrocyankalium der Niederschlag sich bläulich färbte und die Farbe an Intensität in den nächsten Stunden merklich zunahm.

Die Lebensfähigkeit der Spaltpilze ohne Sauerstoff lässt sich auch durch folgenden einfachen und leicht ausführbaren Versuch demonstrieren. Er basirt auf den Thatfachen, dass 1. Blutfarbstofflösungen in sauerstofffreien Räumen ihren Sauerstoff verlieren, indem das Oxyhämoglobin in Hämoglobin übergeht und 2. dass in abgeschlossenen Räumen durch Fäulnissbakterien sehr rasch aller Sauerstoff absorbiert wird. Die Versuchsanordnung war folgende:



Figur 2.

Der Apparat besteht aus 2 Kolben (A) und (B) (s. Fig. 2), welche zuerst beschickt und später bei a zusammengeschmolzen werden. Der kleinere Kolben (A) von etwa 150 ccm Inhalt wurde zuerst sorgfältig gereinigt, sodann über freier

Flamme geglüht und mit einem Wattepfropfen verschlossen, nach dem Erkalten mit 100 ccm gut ausgekochter 5% Gelatinelösung bis b gefüllt und mit Watte verschlossen, erkalten gelassen. Während der Zeit wird der Kolben B von etwa 500 ccm Inhalt mit 10% Gelatinelösung zu etwa  $\frac{3}{4}$  gefüllt und mit etwas Pankreassaft versetzt. Man präparirt sich andererseits aus frischem Blute durch Gefrieren krystallisiertes Hämoglobin, löst etwas davon in ausgekochtem, wieder erkaltetem Wasser auf und filtrirt die Hämoglobinlösung in ein ausgeglühtes, während des Erkaltes mit

Wattepropf verschlossenes Reagenzröhrchen. Jetzt wird die Flüssigkeit in A mit soviel der Oxyhämoglobinlösung gefärbt, dass sie namentlich an der Verjüngung oberhalb b deutlich die beiden Absorptionsstreifen des Oxyhämoglobins zeigt. Nunmehr wird der Hals von B bei c umgebogen und die beiden Kolben A und B bei a zusammengeschmolzen.

Zwei so beschickte Apparate wurden in einem Wasserbade von constanter Temperatur von  $38^{\circ}$  aufgestellt. Mit dem Unterschiede, dass während bei dem einen die beiden Kolben im Wasser eintauchten, bei dem anderen nur der grössere (B) auf die Bruttemperatur erwärmt war, der kleinere (A) ausserhalb des Wasserbades sich befand. Die Ableitungsröhrchen d beider Apparate tauchten in Quecksilber ein. Bald darauf erstarrte die Gelatinelösung in dem nicht erwärmten kleineren Kölbchen und verblieb so bis zum Tage, an welchem auch dieses Kölbchen in das Wasserbad eingetaucht wurde, ein Beweiss, dass der Inhalt nicht faulte.

Nach 48 Stunden konnte man starke Fäulniss in den mit Pankreas versetzten Gelatinelösungen sehen. Die Flüssigkeiten wurden trübe und auf ihrer Oberfläche entwickelte sich eine Bacterienhaut, die sich allmählich zu Boden der Kolben senkte. Ueber dem Quecksilber sah man reichlich Gasblasen entweichen. Der Inhalt der kleineren Kölbchen blieb vollkommen klar und noch nach 50 Stunden sah man spectroscopisch die beiden Streifen des Oxyhämoglobins. Am dritten Tage hat die Fäulniss etwas nachgelassen, doch dauert noch immer die Gasentwicklung fort. Der Inhalt des Kölbchens A, obgleich vollkommen klar, zeigt jetzt nur einen Streifen des reducirten Hämoglobins<sup>1)</sup>. Am sechsten Tage der Fäulniss, an welchem die Flüssigkeit in den beiden Kölbchen A noch ganz klar war und nur den Streifen des reducirten Hämoglobins

1) Nach den Bestimmungen Hoppe-Seylers (Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. I, p. 124) zeigen verdünnte Hämoglobinlösungen mit Gasgemischen, welche nur 0,19 Vol. % Sauerstoff enthalten, geschüttelt noch die beiden Oxyhämoglobinstreifen. — Die Umwandlung des Oxyhämoglobins zu Hämoglobin konnte hier nicht etwa durch die geringe, in dem Kolben (B) entwickelte Menge Schwefelwasserstoffs geschehen, da sonst im Spectrum ausser dem Bande des reducirten Hämoglobins auch das des Schwefelwasserstoffhämoglobins sichtbar werden müsste.



globins zeigte, wurden die Ableitungsröhrchen unter Quecksilber mit einem Kautschukröhrchen überzogen und das Letztere mittelst einer Péan'schen Sperrpincette, wie sie in der Chirurgie zur Gefäss-Unterbindung gebräuchlich sind, geschlossen, wodurch etwas Quecksilber in das Ableitungsröhrchen gepresst wird. Nunmehr lässt man durch Neigen des Kolbens B einige Tropfen von der faulen Flüssigkeit in A hineinfließen. Der Verschluss mittelst der Pincette und der Quecksilbersäule im Ableitungsröhrchen bieten völlige Garantie, dass während des Inficirens keine Spur Luft von aussen in den Raum zwischen a und f gelangen kann. Die in A nach der Infection eintretende Fäulniss geschieht also in einer ganz sauerstofffreien Flüssigkeit.

Erst am dritten Tage wurden die Flüssigkeiten in den kleineren Kölbchen trübe. In den folgenden Tagen schritt die Fäulniss weiter fort, während sich ein grauer Bodensatz von Bacterien bildete und Gasblasen entwichen. Am vierten Tage nach der Infection wurde das aus einem der Kölbchen A während 48 Stunden entweichende Gas (im Ganzen 32 ccm) gesammelt. Das Gas bestand aus 99,5 Vol. %  $\text{CO}_2$  und 0,5 Vol. % H. Am neunten Tage nach der Infection wurde der Versuch unterbrochen. Der Inhalt der beiden Kölbchen A zusammengegossen und zunächst der Bodensatz mikroskopisch untersucht. Derselbe bestand aus lauter Spaltpilzen, der bemerkenswerther Weise nicht wie sonst bei Luftabschluss nur Coccen- und Köpfchenbacterien, sondern ausser diesen auch zahlreiche in Theilung begriffene Individuen des *Bacillus subtilis* enthielt. Die faulig riechende Flüssigkeit wurde jetzt mit 20 ccm 30 %  $\text{SO}_4\text{H}_2$  angesäuert und die flüchtigen Fettsäuren abdestillirt. Ihre Menge betrug auf Essigsäure bezogen 2,86 gr = 28,6 % von dem Gewichte der verfaulten Gelatine.

---