

Ueber sauerstoffgasfreie Medien;

von

Dr. J. W. Gunning,

Prof. der Chemie an der Universität Amsterdam.

Bekanntlich behauptet Pasteur, dass es bei den Mikroorganismen zwei distincte Lebensäusserungen giebt: die aërobie und die anaërobie. Letztere soll dadurch charakterisirt sein, dass die Organismen in diesem Zustande, ohne freien Sauerstoff zu verzehren, nicht nur leben, sondern auch energische Functionen vollziehen, nämlich die mit den Namen Gährung und Fäulniss angeordneten Spaltungen complexer Moleküle. Anfänglich heftig bestritten, scheint diese Ansicht indessen, besonders nachdem Brefeld seine Polemik gegen dieselbe aufgegeben hat, sich einer stets allgemeiner werdenden Aufnahme zu erfreuen, und sogar zum Dogma erhoben zu werden. Obgleich ich nun den genannten Autoren gegenüber keine Autorität in diesen Dingen beanspruchen kann, so wird es mir doch im Interesse der Wissenschaft erlaubt sein, bescheidenen Zweifel zu hegen an die Berechtigung jenes Standpunktes. Die Pasteur'sche Ansicht widerspricht dem von Lavoisier herrührenden, von Liebig allseitig begründeten Satze, dass die „erste und wichtigste Ursache aller Umwandlungen und Veränderungen der organischen Atome die chemische Action des Sauerstoffs ist.¹⁾ In diesem Princip culminiren alle bisherigen Inductionen der allgemeinen biologischen Chemie. Freilich wird die Tradition in der Naturwissenschaft nie zum Dogma; es muss aber daran erinnert werden, dass jene nicht auf Speculation, sondern auf dem Experimente fusst. Damit soll gesagt sein, dass dasjenige, was Herkömmliches umstürzen will, experimentell fester begründet sein muss, als dieses. Es ist gar nicht undenkbar, dass tieferes Eindringen in die Erscheinungen zu Einschränkung des alten Satzes nöthigen können, vorher muss

¹⁾ Chemische Briefe XIX.

aber bewiesen werden, dass die jetzige experimentelle Zergliederung der Natur an Schärfe und Gewissenhaftigkeit der früheren nicht nachsteht. Quod probandum!

Ich will für den Augenblick nur darauf hinweisen, dass in keinem einzigen der Experimente, wo angeblich Hefezellen oder sonstige niedrige Organismen ohne freien Sauerstoff functionelle Lebensäusserungen gezeigt haben, die Abwesenheit des Sauerstoffs direct constatirt ist. Man hat sich immer nur auf anderweitige Thatsachen gestützt und daraus diese Abwesenheit postulirt, aber den Werth dieser Thatsachen nicht immer angemessener Weise discutirt. Was unter das übliche „letzte Spuren“ zu verstehen sei, ist grundverschieden in Beziehung auf die Grössen, um welche es sich in den verschiedenen Fällen handelt. Bei Untersuchungen über die Lebensbedingungen der Mikroorganismen, deren Körpergewicht sich jeder Bestimmung entzieht, über deren Stoffwechsel nichts bekannt ist, kommen Stoffmengen in Betracht, kleiner als bei jedem anderen Gegenstand.¹⁾ Anhaltspunkte für die Frage nach dem Minimum an Sauerstoff, der diese Geschöpfe zu Lebensäusserungen befähigt, existiren zur Zeit nicht. Dazu kommt noch manche andere Schwierigkeit: die Art und Weise, wie Sauerstoff in Flüssigkeiten, besonders organischen, aufgelöst oder lose gebunden vorkommt, die Verdichtung der Gase auf Glasoberflächen²⁾, die Existenz von Gasschichten zwischen Glas und Flüssigkeiten, die Gasdiffusionen an Kautschuck und sonstigen Verschluss- und Dichtungshilfsmitteln u. s. w., das alles sind Factoren, die

¹⁾ In seinem Werke „die niederen Pilze u. s. w.“, München, R. Oldenbourg, das mir während des Drucks dieser Abhandlung zur Hand kommt, nimmt C. von Nägeli an (S. 7), dass die grösseren der Spaltpilze ein Körpergewicht von $\frac{1}{2000000}$ Milligramm. besitzen. Setzt man ihren Sauerstoffbedarf gleich dem eines erwachsenen Menschen, also ungefähr 1 Proc. des Körpergewichts, so würden z. B. eine Million Bacterien unter diesen extremen Voraussetzungen in 24 Stunden $\frac{1}{20000}$ Milligramm. oder ungefähr $\frac{1}{30000}$ Cc. Sauerstoff verzehren.

²⁾ Diese Verdichtung hat schon Regnault und Stas beschäftigt. Prof. Dibbitts in Utrecht bestimmte dieselbe annähernd an einer Glasoberfläche von 71 □ Cent. auf 2 bis 3 Milligramm. Luft.

hier sehr in's Gewicht fallen und zu deren gehöriger Beachtung es manchem Chemiker, der bloß durch synthetisches Arbeiten ausgebildet ist, wohl an Zeit und Geduld fehlen kann.

So lange der alte Grundsatz: *Omne vivum ex oxygenio* noch gültig war, könnte man mit Brefeld das Erscheinen oder das Fortleben einer Zelle als entscheidendes Reagens auf Sauerstoff betrachten. Der Angriff Pasteur's machte aber natürlich diese Waffen unbrauchbar. Zur Sicherstellung der anaëroben Lebensform müßten sauerstofffreie Medien, Zuchtträume für die hierzu gehörigen Organismen hergestellt werden. Pasteur verließ sich zu diesem Zwecke bei seinen Hauptexperimenten auf die üblichen Versuchsanordnungen: Auskochen, Abschließung der Luft mittelst Quecksilbers oder Glashähne; nur in einzelnen Fällen machte er von dem Schützenberger'schen Verfahren, Sauerstoff in Flüssigkeiten zu bestimmen, Gebrauch. In einigen Versuchen wurde auch die Bildung von Kohlensäure oder das Auftreten von gewissen reduzierenden Körpern als Beweis für die Abwesenheit des Sauerstoffs betrachtet. Auch Hüfner benutzte das Auskochen als Hilfsmittel zur Beseitigung des atmosphärischen Sauerstoffs.¹⁾ Reagentien zur Nachweisung von etwa zurückgebliebenem Sauerstoff wurden von diesen Experimentatoren nicht gebraucht. M. Traube²⁾ dagegen wendete eine mit Indigo versetzte Lösung von Traubenzucker in Soda an, und operirte in einer Kohlensäure-Atmosphäre. Von seinen Versuchen sagt er, „die schärfste Kritik wäre ausser Stande, an seiner Methode einen Mangel zu entdecken“, und er glaubt dadurch die „überraschende und physiologisch höchst bedeutsame Entdeckung Pasteur's über alle Zweifel hinaus festgestellt zu haben“. Solche Ausdrücke sind aber keine Belege für die Richtigkeit der Schlussfolgerungen, sondern für die Leichtfertigkeit, womit dieselben gezogen sind.

Die Reagentien auf und die Absorptionsmittel für

¹⁾ Dies. Journ. (1876) 13, 475.

²⁾ Ber. Berl. chem. Ges. (1877) 10, 511.

Sauerstoff spielen in diesen Untersuchungen eine so wichtige Rolle, dass der Entscheidung der Hauptfrage eine gründliche Discussion über deren Grenze und Sicherheit vorangehen muss. Diese Ueberzeugung hat im vorigen Jahre einen jungen holländischen Chemiker veranlasst, die Doctorwürde auf diesem Gebiete zu erkämpfen. In seiner Dissertation¹⁾ vergleicht er die bekannten Reagentien und kommt zu dem Schlusse, dass das Leuchten des Phosphors unter allen das empfindlichste ist, vorausgesetzt, dass der Raum nichts enthalte, wodurch das Leuchten verhindert sein könnte. Wiewohl die Versuche Gratama's nicht gestatteten, die verschiedenen Reagentien unter vollkommen gleichen Bedingungen mit einander zu vergleichen — was auch äusserst schwer sein dürfte, aber für die Feststellung der Empfindlichkeitsreihe sehr erwünscht wäre — so kann doch seine Schlussfolgerung als eine werthvolle Bestätigung der bisherigen Ansichten der Chemiker betrachtet werden.

Nachdem mehrere Versuche mich darüber belehrt hatten, dass Fäulniss- und Bacterienbildung eintreten in Wasserstoff- und Stickstoffatmosphären, in welchen Phosphor nicht mehr leuchtet²⁾, wendete ich mich zur Frage, ob diese Atmosphären als sauerstofffrei angesehen werden dürfen. Schon Joubert (Staedel's Jahresbericht für 1874, S. 565) hat angegeben, dass das Leuchten, bei einer bestimmten Temperatur, aufhört, wenn der Sauerstoffdruck eine übrigens nicht bestimmbare Grenze überschritten hat. Ich habe mich überzeugt, dass ein Stück befeuchteten Phosphors in einem Glaskolben beim schnellen Evacuiren zu leuchten aufhört, bevor der Manometer auf Null steht. Hierbei mag aber die bedeutende Temperaturerniedrigung eine Rolle spielen. Folgender Versuch ist schlagender, und beweist zugleich — was für unseren Zweck von Bedeutung ist — dass der Phosphor beim Aufhören des

1) W. D. Gratama, Onderzoek naar het gevoeligste reagens op zuurstof. Groningen, P. van Zweden, 1876.

2) In diesen Versuchen wurde der Phosphordampf mittelst Chromsäurelösung fortgeschafft.

Leuchtens dennoch fortfährt, Sauerstoff zu absorbiren.¹⁾ Im leeren Raum eines improvisirten Barometers leuchtet der Phosphor immer, aber nur auf beschränkte Zeit; das Leuchten fängt aber sogleich wieder an, wenn der Apparat erwärmt, oder der Barometer tiefer in's Quecksilber gesenkt wird. Auch dieses zweite Leuchten hört nach einiger Zeit wieder auf und kehrt abermals zurück bei wiederholter Erhöhung der Temperatur oder des Druckes. Diese Erscheinungen folgen in so kurzen Zeiträumen auf einander, dass die Annahme einer Diffusion von Sauerstoff zwischen Quecksilber und Glas nicht zulässig erscheint.

Es war von hohem Interesse, zu wissen, wie weit diese Sauerstoffabsorption des nicht-leuchtenden Phosphors reicht; dazu musste natürlich ein Reagens aufgefunden werden, das den von nicht-leuchtendem Phosphor nicht absorbirten Sauerstoff anzeigt, mit anderen Worten empfindlicher ist als Phosphor. Diesen Dienst leistet der bekannte Niederschlag, welchen gelbes Blutlaugensalz mit einem Ferrosalze giebt. Dieser Niederschlag ist im reinen Zustande vollkommen weiss, wird aber erfahrungsgemäss fast nie oder nur auf einen Augenblick mit dieser Farbe erhalten, was seine Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff beweist, aber auch den Verdacht erweckt, dass die Bläue von Wasserzersetzung herrühren könnte. Dass letzteres nicht der Fall sei, wird durch folgenden Versuch bewiesen. Man füllt ein Reagensrohr mit einer trocknen Mischung von ungefähr 1 Theil Eisenvitriol und 2 Thln. gelben Blutlaugensalzes, beide in grobem Pulver, zieht aus, füllt mit Wasser und schmilzt zu, so wenig wie möglich Luft im Rohr zurücklassend. Der grösste Theil der Verbindung wird jetzt weiss erhalten und kann auf unbestimmte Zeit so verwahrt werden. Auch von gährenden und faulenden Flüssigkeiten, die kein Schwefelammon entwickeln (am besten von inficirter Hefeabkochung) in zu-

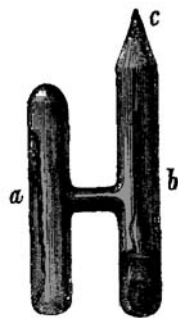
¹⁾ Dasselbe Resultat folgert sich auch aus einem l. c. erwähnten Versuche Joubert's über das periodische Leuchten des Phosphors in einer mit Wasser abgeschlossenen, nahezu sauerstofffreien Atmosphäre.

geschmolzenen Glasröhrchen, wird das an der Luft eben gebläute Präcipitat wieder weiss, ebenso unter Schwefelwasserstoffwasser.

Fig. 1 stellt den Apparat vor, dessen ich mich anfangs bediente für Versuche mit diesem Präcipitat. Die Innenfläche des Röhrchens a ist mit angeschmolzenem farblosem Phosphor theilweise bedeckt; das Röhrchen b, welches an ersteres angeschmolzen ist, enthält ein Kölbchen mit einigen Tropfen einer der Lösungen, die den Niederschlag erzeugen, die andere ist im Rohr selbst enthalten. Die Eisenslösung muss natürlich ganz frisch sein, und wird noch mit einem Tropfen unterschwefligsaurer Natronlösung versetzt. Das Ganze wird gleich nach dem Einfüllen bei c an einer Luftpumpe befestigt und nach dem Evacuiren abgeschmolzen (damit die abgeschmolzene Stelle nicht nachher Risse bekomme, bedeckt man sie noch warm mit Siegelack). Wenn der Apparat umgekehrt wird, fliessen die Lösungen zusammen, und man überzeugt sich sehr leicht davon, dass dieser Niederschlag stets bläulich ist, wenngleich dem Phosphor mehrere Tage lang die Gelegenheit geboten war, den Raum von Sauerstoff zu befreien. Die Bläuung ist stärker, wenn diese Zeit kurz ist, aber in Apparaten von 30—40 Cc. Inhalt ist selbst nach vier Wochen noch Sauerstoff nachzuweisen. Der Niederschlag erscheint dann allerdings weiss, bläut sich aber doch nach einiger Zeit. Auf Grund dieser Versuche halte ich den Phosphor für unfähig, dergestaltige Räumlichkeiten sauerstofffrei zu machen, und scheint mir jeder Versuch, wo man behauptet, mit Phosphor die „letzten Spuren“ Sauerstoff aus irgend welchem Apparat fortgeschafft zu haben, in letzterer Hinsicht mindestens verdächtig.

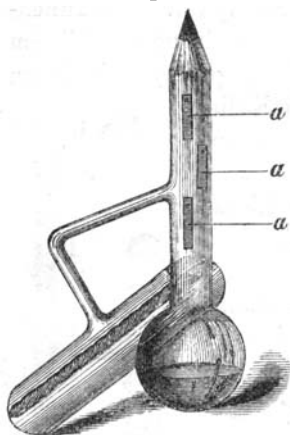
Für die Herstellung sauerstofffreier Räume eignen sich ungleich besser Mischungen von Ferrosalzen mit überschüssiger Natronlauge und noch mehr — wegen ihrer Homogenität — eine Lösung von reducirendem Zucker in

Fig. 1.



Natronlauge, besonders beim Erhitzen. Zu Versuchen mit diesen Materialien wurde der Apparat Fig. 2 gebraucht, wo zugleich die Blutlaugensalzlösung ersetzt wird durch

Fig. 2.



kleine Streifen von Papier, mit dieser Lösung getränkt und wieder getrocknet (a). Diese Streifen werden in verschiedenen Höhen angeklebt und gewähren also die Möglichkeit, mit einer Füllung des Apparates zu verschiedenen Zeiten das Eintreten der Bläuung zu versuchen. Man hat nur dafür zu sorgen, dass die absorbirende Flüssigkeit bei seitwärts um 90° gedrehter Stellung des Apparates nicht in die andere Röhre überläuft. Es gelingt, mit alkalischer Zuckerlösung, die man von Zeit

zu Zeit ein wenig erwärmt, in dieser Manier die Bläuung der Papiere nach 24 Stunden aufhören zu machen, vorausgesetzt, dass der Apparat luftleer war. Denn die Erfahrung zeigt, dass die Absorption des Sauerstoffs aus dem luft erfüllten Raum eine ungleich längere Zeit in Anspruch nimmt. Für diese Versuche mit luft erfülltem Raum eignen sich sehr gut Apparate mit eingeschliffenen Glasstöpseln auf beiden Röhren, wodurch dieselben, so oft man will, gebraucht werden können. Für diese Versuche ist es auch unumgänglich nothwendig, die Eisensolution vor Oxydation zu schützen. Man erreicht diesen Zweck am besten dadurch, dass man die Lösung beim Einfüllen mit etwas mehr unterschwefligsaurem Natron versetzt und mit verdünnter Schwefelsäure ansäuert.

Mit Hülfe des neuen Reagens überzeugt man sich bald, dass die gewöhnlichen Ansichten über die Herstellung und Erhaltung sauerstofffreier Medien und Räume sehr unvollständig und theilweise unrichtig sind. Es wird natürlich nicht behauptet, dass die Erzeugung des oft erwähnten Niederschlages in vollkommen weissem Zustande

ein Beweis ist, dass das Gas oder die Flüssigkeit, worin derselbe sich gebildet hat, sauerstofffrei seien. Darüber kann überhaupt nicht mit Hülfe von Reagentien geurtheilt werden. Eine Negation lässt sich doch nicht mit That-sachen beweisen. Aber wir sind jetzt im Stande, diejenigen Gase, Flüssigkeiten und Apparate, welche bisher auf Grund der Darstellungs- und Reinigungsweise als sauerstofffrei oder auf Grund der Anordnung als für Sauerstoff unzugänglich betrachtet wurden, besser zu untersuchen, und wir werden dabei erfahren, dass dieselben manchmal unseren Voraussetzungen nicht entsprechen. Ein paar Beispiele werden genügen, dies zu zeigen, und zugleich die verschiedenen Arten, das Reagens zu benutzen, in's Licht stellen.

Es wurden Apparate zusammengesetzt, welche es ermöglichten, ohne Nachfüllen, im ununterbrochenen Strome mehrere Hundert Liter Kohlensäure oder Wasserstoff zu erzeugen. Die Apparate bestanden blos aus Glas, Kautschukpropfen und Kautschukröhrchen, letztere aber so, dass die Glasröhren, welche sie zusammenhielten, mit ihren Endflächen unmittelbar an einander stiessen. Das Gas passirte ein Glasrohr, welches an zwei Stellen nach unten etwas ausgeblasen war, und hier die zwei Flüssigkeiten enthielt, deren Mischung den weissen Niederschlag giebt. Nachdem während 24 Stunden ungefähr 100 Liter durchgegangen waren, liess man, ohne den Strom zu unterbrechen, die Flüssigkeiten zu einander fliessen. Die Mischung war stets bläulich; nur in einem Falle, beim Wasserstoffapparat, wo sich in der Eisenlösung etwas Schwefeleisen gebildet hatte, war das Präcipitat vollkommen weiss. Das war aber nur darum so, weil das hydratische Schwefeleisen in saurer Flüssigkeit die blaue Verbindung reducirt.

Sehr dünnwandige, kolbenartig ausgeblasene Glasröhrchen wurden mit einer inficirten Hefeabkochung, zu der ein wenig gut ausgewaschenes und in Folge dessen stark gebläutes $(K_2Fe)Cy_6Fe$ gesetzt war, gefüllt und zugeschmolzen. Nach einigen Tagen in der Brutwärme ist

die Eisenverbindung reducirt und der Inhalt der Röhren weiss geworden. Um eine Flüssigkeit auf die Anwesenheit des freien Sauerstoffs zu prüfen, wird eins dieser Röhren eingebracht und nach einer gewissen Zeit, wenn von der an der Aussenfläche hängenden Luftschicht kein Einfluss mehr befürchtet wird, durch Stoss zerbrochen. Wenn man ein derartiges Röhren in einen Wasser enthaltenden Kolben bringt, das Wasser an der Luftpumpe auskocht, den Kolben nach sorgfältigster Evacuierung zuschmilzt und das Röhren zerbricht, so erkennt man den wahrscheinlich nie fehlenden Sauerstoffgehalt des ausgekochten Wassers.

Bringt man in ein mit H_2S -Gas auf gewöhnliche Art gefülltes Reagenrohr saure Eisenlösung, mit H_2S gesättigt, neben ein Kölbchen, das ebenso mit H_2S gesättigte Blutlaugensalzlösung enthält, und schmilzt man das Rohr zu, so findet man, wenn letzteres nach einigen Stunden umgekehrt wird, den sich bildenden Niederschlag mehr oder weniger blau. Derartige Versuche mit SO_2 liefern dasselbe Resultat. Es geht daraus hervor, dass die Anwesenheit selbst von ziemlich grossen Mengen stark reducirender Stoffe in geschlossenen Räumen die Abwesenheit des freien Sauerstoffs nicht verbürgt.

Zum Schluss komme ich mit einem Worte auf den oben erwähnten Traube'schen Versuch zurück. Es ist wohl nicht anzunehmen, wenigstens im Entferntesten nicht bewiesen, dass die Kohlensäureatmosphäre des Versuchs und das über der Hefe stehende Wasser sauerstofffrei gewesen seien. — Im zugeschmolzenen Versuchsrohr war somit Sauerstoff, und nur das kann fraglich sein, ob derselbe von dem reducirten Indigo oder von den neu gebildeten Hefezellen fixirt worden ist.

Ich habe von dem in diesem Aufsätze angedeuteten Standpunkte aus viele Versuche über die Hauptfrage — das Leben niedriger Organismen ohne freien Sauerstoff — gemacht, und werde mir erlauben, deren Resultate in Kurzem in diesem Journale mitzutheilen.

Juli, 1877.
