Der Differential-Coli-Nachweis mittels der Neutralrotreaktion in Beziehung zum Redoxpotential

Autor(en): **Acklin, O. / Vuillemin, R.**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **25 (1934)**

Heft 2-3

PDF erstellt am: **28.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-983261

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

actuellement très intensifs et souvent assez tardifs, cette teneur est très faible et en tout cas hors de proportion avec les quantités de sels cupriques adhérentes aux raisins au moment du pressurage. Une partie de ces sels est retenue dans le marc, l'autre passe dans le moût et s'élimine au fur et à mesure de la fermentation. L'élimination du cuivre initialement présent dans le moût est la conséquence même de cette fermentation; c'est en effet *dans les lies* et non dans les bourbes que se retrouve la majeure partie de ce métal. Une expérience en cave nous a permis de montrer que le 90% au moins du cuivre contenu dans le moût s'était éliminé ainsi en décembre, de sorte qu'à cette époque déjà, le vin n'en contenait plus que 3 mg par litre. Six mois après, cette teneur tombait au-dessous de 0,5 mg.

Certains vins, cependant, peuvent présenter des teneurs anormales, par suite de fermentations défectueuses ou d'un apport accidentel par la vaisselle vinaire.

D'autre part, la teneur en cuivre des jus stérilisés commerciaux est beaucoup plus élevée que celle des vins, et sur 6 échantillons examinés provenant de raisins sulfatés, 4 présentaient des teneurs supérieures à 10 mg par litre. Par contre, 4 échantillons provenant de raisins d'hybrides producteurs directs se révélèrent conformes aux dispositions de l'Ordonnance fédérale du 23 février 1926.

La persistance du cuivre dans les jus de raisins sans alcool s'explique par le fait que l'élimination de cet élément par les procédés ordinaires de stérilisation est le plus souvent insignifiante. Dans les «moûts concentrés», comme il fallait s'y attendre, les doses de cuivre sont plus élevées encore. Seuls les jus de raisins d'hybrides producteurs directs (donc non sulfatés) peuvent, en principe, se trouver exempts de cuivre ou du moins n'en contenir que des traces.

Der Differential-Coli-Nachweis mittels der Neutralrotreaktion in Beziehung zum Redoxpotential.

Von Dr. O. ACKLIN und Dr. R. VUILLEMIN.

(Aus dem Hygiene-Institut der Eidg. Techn. Hochschule, Zürich.)
— Abteilung für Wasser, Boden und Luft —

Auf der grundlegenden Beobachtung von *Rothberger*[1]), dass in Kulturen von Bact. Coli bei Zusatz von Neutralrot rasch eine Grünfluoreszenz auftritt, die er bei Bact. Typhi nicht konstatieren konnte, beruht die in der Bakteriologie bekannte Neutralrot-Reaktion. Als Kulturdiagnostikum in der Coli-Typhus-Gruppe findet sie heute vor allem bei Wasseruntersuchun-

[1]) *Rothberger*, Centr. Bakt. Parasitenk., 1. Abt., **24**, 513 (1898); **25**, 15, 69 (1899).

gen zum Nachweis von fäkalen Verschmutzungen Anwendung. Es sind seither verschiedene Publikationen erschienen, die diese Reaktion abzuklären versuchen: *Guerbet*[2]), *Chamot* und *Sherwood*[3]) und vor allem *Geilinger* und *Schweizer*[4]). Neuerdings ist nun von *Clark*, unter der Mitarbeit von *M. Perkins*, im Anschluss an seine früheren «Studies on oxydation-reduction» auch eine Arbeit über «Neutral-Red»[5]) erschienen, die dadurch besondere Bedeutung hat, dass hier anscheinend zum erstenmal diese Frage vom physikalisch-chemischen Gesichtspunkt aus beurteilt wird.

Bei den Potentialmessungen mit diesem Farbstoff haben wir im besondern zu berücksichtigen, dass das Neutralrot-System, während es sich teilweise als reversibles System verhält — es zeigt zwar hier eine gewisse Instabilität — eine eigenartige zweite Aenderung aufweist, die in einem gewissen pH-Bereich rasch und unmittelbar erfolgt und biologisch von Wichtigkeit ist. Dadurch werden aber Messungen von zuverlässigen Potentialen schwierig und gewisse Grenzen bei der Verwendungsmölichkeit des Neutralrotes als Oxydations-Reduktions-Indikator gesetzt.

Durch rein chemische Versuche konnte nun Clark zeigen, dass verdünnte gepufferte Lösungen von Neutralrot bei rascher Reduktion farblos werden, um an der Luft wieder oxydiert zu werden. Lässt man aber, statt nach der Reduktion sofort wieder zu oxydieren, die Lösungen unter Wasserstoff oder Stickstoff stehen, so bleibt die reduzierte Lösung bei pH = 8,2 längere Zeit farblos, bei pH = 2,7 nimmt sie langsam eine gelbe Farbe mit grüner Fluoreszenz an, bei pH = 5,3 findet die Bildung der gelb-grünen Fluoreszenz äusserst rasch statt. Diese Lösung behält dann bei einer Reoxydation die Fluoreszenz für Tage bei, während saurere oder alkalischere Lösungen hierbei die ursprüngliche Farbe fast völlig, aber nicht ganz gleich, wieder annehmen. Die Fluoreszenz ist noch in wässerigen Lösungen von $\frac{1}{100\,000}$ bei pH = 4—6 bemerkbar; sie wird bei Verdünnung leuchtend. Clark konnte diese fluoreszierende Substanz in Kristallform isolieren: sie ist in Wasser schwach löslich und hat die gleiche elementare Zusammensetzung wie Leuco-Neutralrot; es ist wohl eine Modifikation, in welcher eine Struktur-Asymetrie vorliegt. (Die Dissoziationskonstante ist verschieden.) Die isolierte fluoreszierende Substanz widersteht Oxydationen in neutralen und schwach alkalischen Lösungen für Tage, in fester Form auf Jahre; in stark saurer Lösung konnte sie zu Neutralrot oxydiert werden.

Clark macht allerdings keinen quantitativen Vergleich zwischen der Bildung dieser fluoreszierenden Substanz und deren Bildungsbereich; doch nimmt er mit Bestimmtheit an, dass die Schnelligkeit und der Bereich bei der Potentialeinstellung im Zusammenhang mit dem Auftreten dieser Substanz stehen, die die grüne Fluoreszenz bedingt. Ihre Bildung wäre demnach einem irreversiblen Vorgang zuzuschreiben, der mit einem reversiblen Prozess gekoppelt ist und diesen in gewisser Hinsicht potentiometrisch zu charakterisieren vermag.

Man hat sich verschiedentlich mit der Neutralrot-Frage und im speziellen mit der Anwendung dieses Farbstoffes zur bakteriologischen Differential-Diagnose beschäftigt: zweifellos sind dabei die häufigen Unstimmigkeiten und Unsicherheiten, welche man mit der

---

[2]) *Guerbet*, «Thèse» Univers. Paris (1911).

[3]) *Chamot u. Sherwood*, Amer. chem. soc., **39**, 1755 (1917).

[4]) *Geilinger u. Schweizer*, Biochem. Z., **138**, 73, 92 (1923).

[5]) *Clark u. Perkins*, Studies on oxydation-reduction. XVII. Neutral Red. Amer. chem. soc., **54**, 1228 (1932).

Neutralrot-Reaktion und vor allem auch in der praktischen Wasseruntersuchung zu verzeichnen hat, auf Verwechslungen der Vorgänge zurückzuführen, welche den verschiedenen Farbstoffen zu Grunde liegen, seien es die pH-Verhältnisse bzw. deren Zusammenwirkungen, seien es die stattgefundenen Reaktionen oder das Auftreten der fluoreszierenden Substanz. Heute sollte nun keine Verwechslung mehr möglich sein zwischen der gelben, oxydierten Form in alkalischer Lösung und der gelben Substanz, die durch Reduktion sich bildet. Die gelb-fluoreszierende Substanz, die in reduzierten Lösungen von Neutralrot sich bildet, ist verschieden von der anfänglichen Substanz der Reduktion, und ihre Bildung ist dabei abhängig vom pH-Wert der Lösung. Die meisten Unstimmigkeiten dürften ihre Quelle wohl darin gehabt haben, dass man diese Zusammenhänge nicht richtig erkannt und entsprechend ausgewertet hat.

Wir haben also anzunehmen, dass bei der Rothberger'schen Neutralrot-Reaktion das Bact. Coli die intensivere Reduktion wie Bact. Typhi hervorbringen kann. — Der Arbeit von *Gillespie*[6]), sind im Rahmen der Clark'schen Arbeiten die Potentiale von Platinelektroden in Kulturen von verschiedenen Bakterien-Species verglichen worden[7]). Dabei zeigt sich, dass Bact. Coli ein viel tieferes Potential als Bact. Typhi erreichen kann. Damit scheint der Zusammenhang zwischen dieser Differenzierung mit Elektroden-Potentialen und der Reaktion mit Neutralrot gegeben, wobei natürlich die Genauigkeit und Zulässigkeit zu berücksichtigen ist, die diesen Messungen zukommt. Selbstverständlich ist die Frage, ob die Reaktion unter allen kulturellen Bedingungen eintritt, noch nicht abgeklärt. Trotzdem dürfte, in Anbetracht der heute anerkannten Bedeutung, welche den Potentialverhältnissen in biologischen Systemen zweiffellos zukommt, eine Differentialmethode, die Potentialzustände zu erfassen sucht wie die Neutralrot-Reaktion, weitgehend berechtigt sein, auch wenn sie zur Zeit noch nicht als absolut spezifisch gelten kann.

Bei unsern folgenden, unter bestimmten kulturellen Bedingungen ausgeführten Versuchen wurden verschiedene Vertreter der Coli-Typhus-Gruppe in ihrem Verhalten Neutralrot gegenüber vergleichend bewertet; durch jeweils gleichzeitige pH-Wertbestimmung wurde die Deutungsmöglichkeit der Farbänderung beschränkt.

Als Nährsubstrate wurden drei verschiedene Agar gewählt:

I. Nähr-Agar ohne Kohlehydrat-Zusatz;

II. Nähr-Agar mit Kohlehydrat-Zusatz (Traubenzucker), (nach Vorschrift des im Instituts-Laboratorium für diese Zwecke gebrauchten Nährsubstrates);

III. Nährsubstrat II (mit Traubenzuckerzusatz), wobei aber bei der Herstellung durch Verwendung von primärer und sekundärer Phosphatlösung an Stelle des Wassers eine gewisse Pufferung erzielt wurde (pH = 7,2; pH = 5,8).

Methodik.

Die Versuche wurden durchwegs in Reagensröhrchen von 1,8 cm Weite ausgeführt, die alle mit ungefähr 8 cm³ des Nährsubstrates gefüllt wurden. Der Farbstoffzusatz erfolgte gleichzeitig bei der Ueberimpfung der Keimaufschwemmung und zwar aus einem

[6]) *Gillespie*, Reduction potentials of bacterial cultures and of water logged soils, Soil Sci., **9**, 199 (1920).

[7]) *Clark, Canan, Cohen*, Studies on oxydation-reduction. X. Reduction potentials in cell suspensions Publ. H. Rep. Suppl., 55 (1926).

steril gehaltenen Tropffläschchen. Die Konzentration der Lösung wurde so gewählt, dass bei einer Zugabe von 2—3 Tropfen pro Röhrchen eine genügende, untereinander entsprechende Färbekraft erzielt wurde. (Messung gegen Graulösung im Leitz-Kolorimeter). Als Redox-Farbstoff (VIII) wurde eine 1,5‰ wässrige Lösung von Neutralrot (Indikator «Merck» verwendet.

E_0-Werte bei pH 7,0 : —0,320 (rot)
» 8,0 : —0,382
» 6,0 : —0,265
» 5,0 : —0,205

Die weiteren hier noch verwendeten Redox-Farbstoffe*) I—VII und IX haben folgende E_0-Werte:

a) Bei pH 7,0: I + 0,273
II + 0,217
III + 0,123
IV + 0,011
V — 0,046
VI — 0,125
b) bei pH 7,5: VII — 0,230
IX — 0,350

Zur Darstellung der Entfärbung wurden einheitlich auf der Ordinate die verwendeten Farbstoffe, den entsprechenden Potentialwerten gemäss, aufgetragen; die Abszisse wurde für die zeitlich ausgeführten Beobachtungen verwendet.

Zum Vergleiche sind die verwendeten Nährsubstrate jeweils auch steril geprüft, also nur mit dem Farbstoff versetzt worden; diese sind als Parallelversuche ohne Beimpfung zu bewerten.

Was die Ueberimpfungsmenge der Keime anbetrifft, so sind jeweils gleiche Mengen einer Verdünnung zugesetzt worden, die so gewählt wurde, dass pro Röhrchen ungefähr 1000 Keime verimpft worden sein dürften.

Anfänglich wurden flüssige Nährsubstrate verwendet, die dann auch mit evakuiertem, sterilem Paraffin-Oel (Ph. h. V.) überschichtet wurden (1,5 cm³ pro Reagensröhrchen). Da aber nach einigen Tagen das Oel sich anscheinend mit Luft wieder sättigte und damit den anaeroben Verschluss illusorisch machte, wurde von dieser Versuchsanordnung Umgang genommen und alle weitern Versuche wurden mit Nährsubstraten, denen Agar zugesetzt wurde, ausgeführt.

Die verwendeten Nährsubstrate haben folgende Zusammensetzung:

Traubenzucker-Nährbouillon (für Vorversuch)

1 % Liebigs Fleischextrakt
1 % Pepton
0,5 % Natriumchlorid
0,3 % Traubenzucker

Röhrchen mit 10 cm³ gefüllt

*) Bezüglich genauerer Angabe siehe die Promotionsarbeit von R. Vuillemin, E. T. H. Zürich 1933: «Biochemische Studien zur vergleichenden Bewertung von bakteriologischen Nährsubstraten unter besonderer Berücksichtigung des Oxydations-Reduktionspotentials».

Gew. Nähragar

1 % Liebigs Fleischextrakt
1 % Pepton
0,5 % Natriumchlorid
0,75 % Agar-Agar

Röhrchen mit 8 cm^3 gefüllt

Traubenzucker-Nähragar

1 % Liebigs Fleischextrakt
1 % Pepton
0,5 % Natriumchlorid
0,75 % Agar-Agar
0,3 % Traubenzucker

Röhrchen mit 8 cm^3 gefüllt

Gepufferter Traubenzucker-Nähragar pH = 7,2

1 % Liebigs Fleischextrakt
1 % Pepton
0,5 % Natriumchlorid
0,75 % Agar-Agar
0,3 % Traubenzucker
in prim./sek. Phosphat-Pufferlösung vom pH = 7,2

Röhrchen mit 8 cm^3 gefüllt

Gepufferter Traubenzucker-Nähragar pH = 5,8

1 % Liebigs Fleischextrakt
1 % Pepton
0,5 % Natriumchlorid
0,75 % Agar-Agar
0,3 % Traubenzucker
in prim./sek. Phosphat-Pufferlösung von pH = 5,8

Röhrchen mit 8 cm^3 gefüllt.

Die *Kontrolle und Registrierung der Versuche* erfolgte nach 1, 2, 3 bis 10×24 Stunden; hiebei bedeuten:

● keine Farbänderung (ursprünglich),

◕ ◒ ◔ verschiedene Stufen der Farbstoff-Entfärbung bis zur

○ völligen Entfärbung,

◍ entfärbt, grüne Fluoreszenz,

G Gas-Entwicklung,

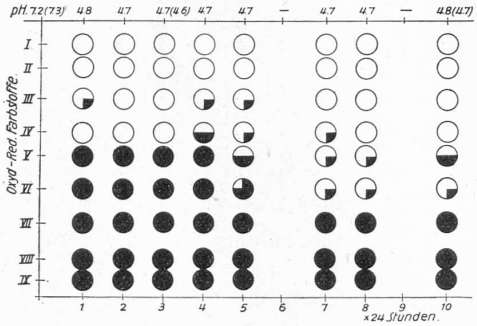
R oben im Röhrchen verbleibender Farbstoffring 0,5—1,5 cm hoch.

Gleichzeitig wurde der pH-Wert bestimmt; die festen Nährsubstrate wurden verflüssigt und nach Abkühlen auf ca. 45° die betreffenden pH-Werte im Hellige-Apparat abgelesen.

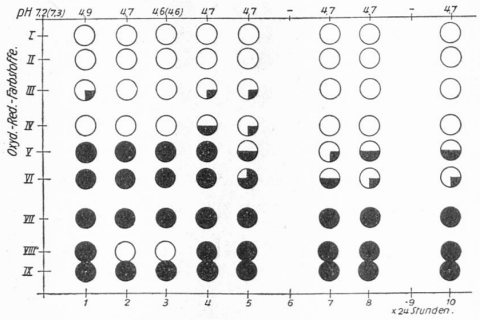
1. Versuch:

Traubenzucker-Nährbouillon mit Coli-Beimpfung (14 A 2) **Redox-Farbstoff- (I—IX) und pH-Prüfung** ohne und mit Paraffinüberschichtung

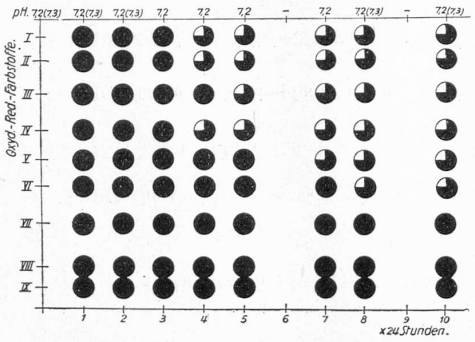
Traubenzucker-Nährbouillon, Coli-Beimpfung



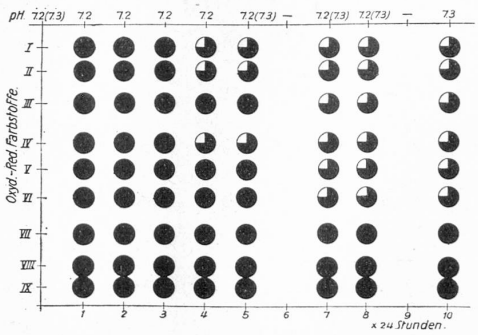
Traubenzucker-Nährbouillon, Coli-Beimpfung mit Paraffinüberschichtung



Traubenzucker-Nährbouillon, steril (Kontrolle)



Traubenzucker-Nährbouillon, steril (Kontrolle) mit Paraffinüberschichtung

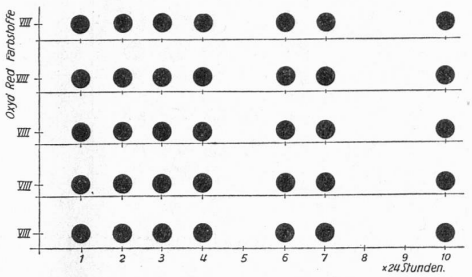


1 a. Nach-Versuch;

Ueberimpfungsmenge und Neutralrot-Farbstoff (VIII) - Zusatz variiert

Traubenzucker-Nährbouillon

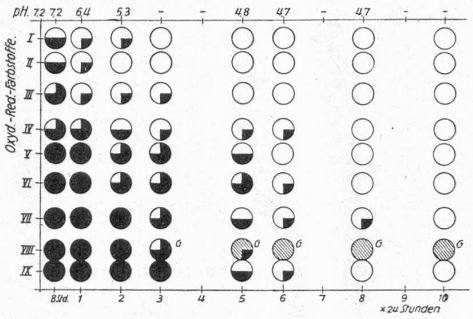
1. 10 fache Coli-Beimpfung, norm. Farbstoffzusatz
2. 100 fache Coli-Beimpfung, norm. Farbstoffzusatz
3. 1000 fache Coli-Beimpfung, norm. Farbstoffzusatz
4. 10 000 fache Coli-Beimpfung, norm. Farbstoffzusatz
5. norm. Coli-Beimfung, 5 facher Farbstoffzusatz



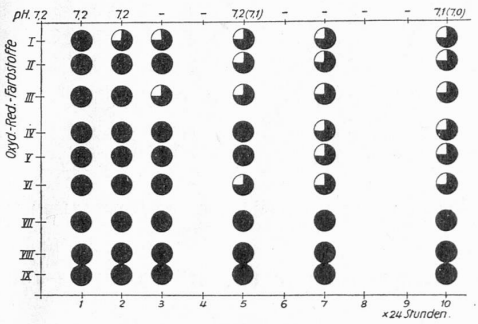
2. Versuch:

Traubenzucker-Nähragar mit Coli-Beimpfung (14 A 2) Redox-Farbstoff (I-IX) und pH-Prüfung

Traubenzucker-Nähragar, Coli-Beimpfung



Traubenzucker-Nähragar, steril (Kontrolle)



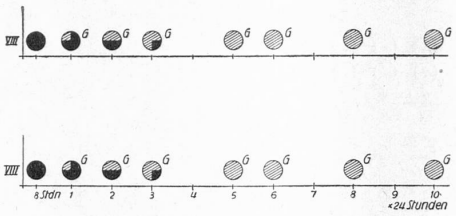
2a. Nach-Versuch.

Ueberimpfungsmenge variiert

Traubenzucker-Nähragar

50 fache Coli-Beimpfung

100 fache Coli-Beimpfung



3. Versuch:

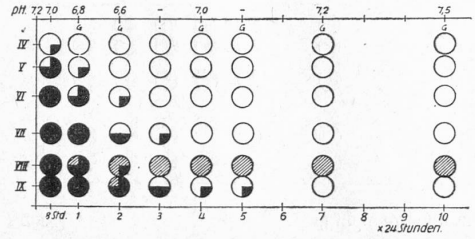
Agar I = gew. Nähragar
Agar II = Traubenzucker-Nähragar
Agar III = Traubenzucker-Nähragar, gepuffert, pH = 7,2
Agar IV = Traubenzucker-Nähragar, gepuffert, pH = 5,8

mit

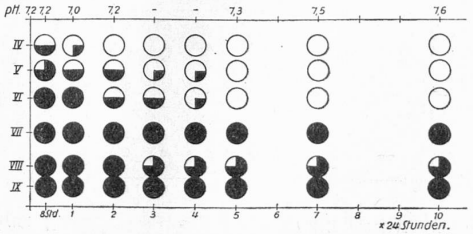
Coli-Beimpfung (14 A 5)
Coliform-Beimpfung (17 A 4)
Typhus-Beimpfung (VI/4)
Paratyphus A-Beimpfung (VII/2)

Redox-Farbstoff- (IV—IX) und pH-Prüfung

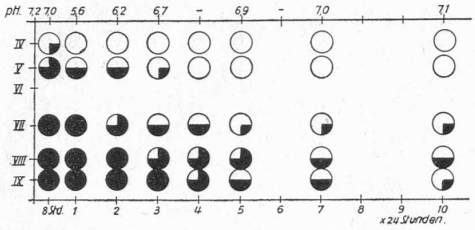
Agar I Coli-Beimpfung



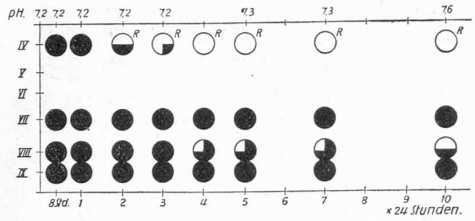
Agar I Coliform-Beimpfung



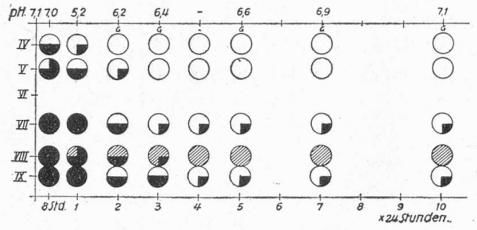
Agar I Typhus-Beimpfung



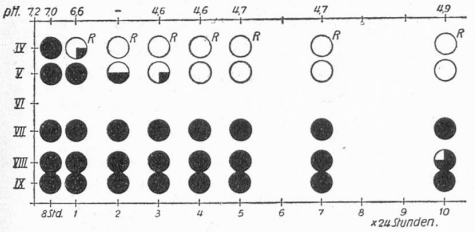
Agar II Coliform-Beimpfung



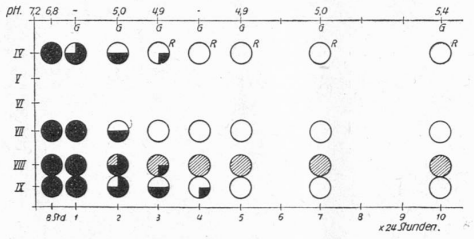
Agar I Paratyphus A-Beimpfung



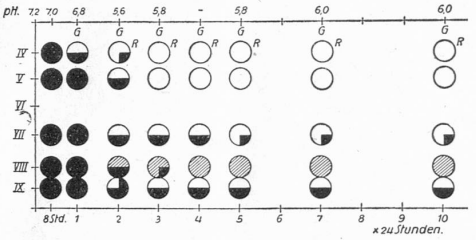
Agar II Typhus-Beimpfung



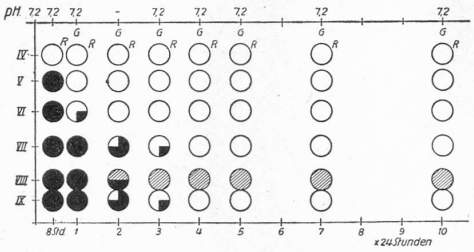
Agar II Coli-Beimpfung



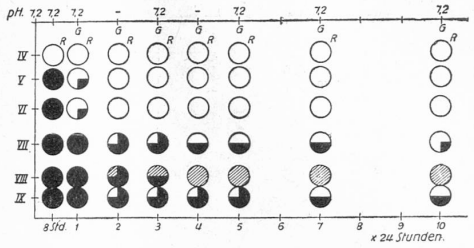
Agar II Paratyphus A-Beimpfung



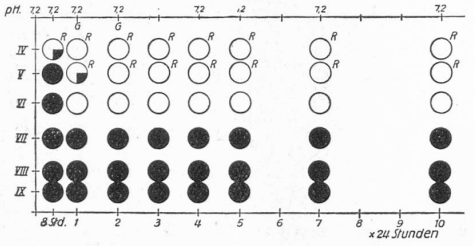
Agar III Coli-Beimpfung



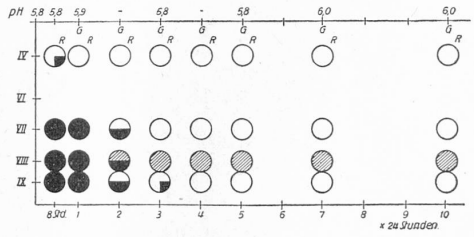
Agar III Paratyphus A-Beimpfung



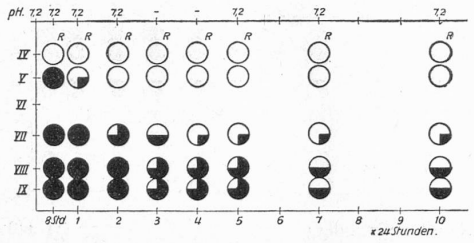
Agar III Coliform-Beimpfung



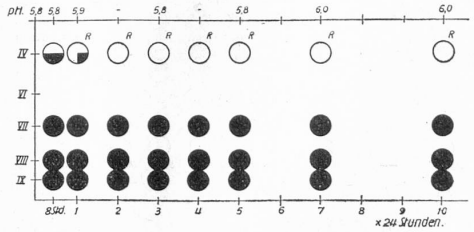
Agar IV Coli-Beimpfung



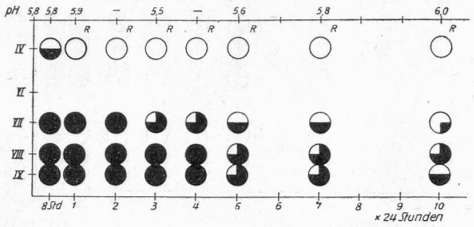
Agar III Typhus-Beimpfung



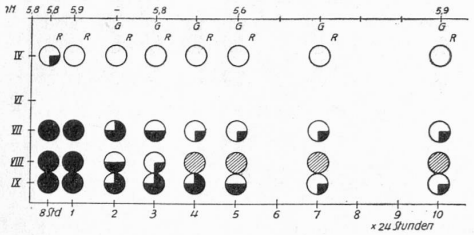
Agar IV Coliform-Beimpfung



Agar IV Typhus-Beimpfung

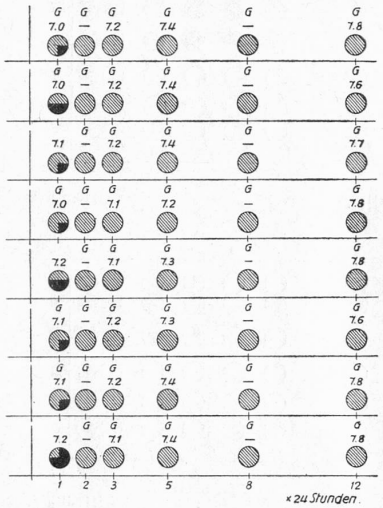


Agar IV Paratyphus A-Beimpfung



4. Versuch (Serienmässiges Nachprüfen des 3. Versuches):

Agar I Coli-Beimpfung

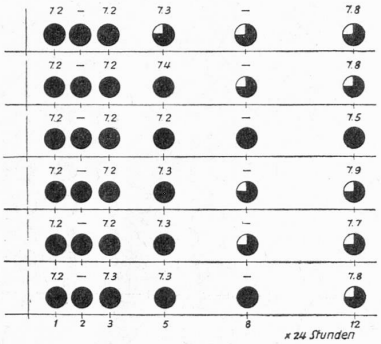


Agar I = gew. Nährагar
Agar II = Traubenzucker-Nährагar
Agar III = Traubenzucker-Nährагar, gepuffert, pH = 7,2
Agar IV = Traubenzucker-Nährагar, gepuffert, pH = 5,8
} mit

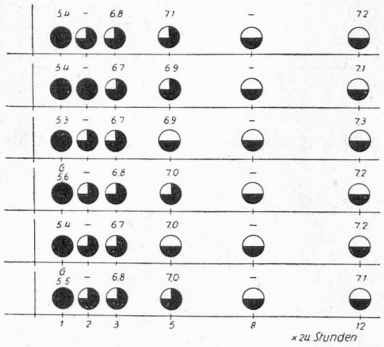
Coli-Beimpfung (6 A 1, 6 A 5, 14 A 17, 17 A 10, 20 A 2, 23 A 1, 15/26, 15/27)
Coliform-Beimpfung (14 A 6, 17 A 5, 31/4a, 25 A 2, 26 A 3, 27 A 1)
Typhus-Beimpfung (H 901, 230/36, XIV/1001, X/1408, 1251, 1194
Paratyphus A-Beimpfung
(PI, 1187, 2011)
Paratyphus B-Beimpfung
(174/41, 765/31)

Neutralrot (Farbstoff VIII) und pH-Prüfung

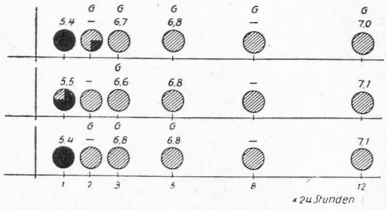
Agar I Coliform-Beimpfung



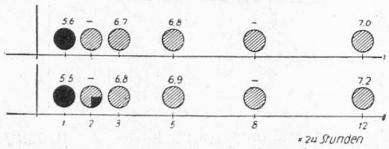
Agar I Typhus-Beimpfung



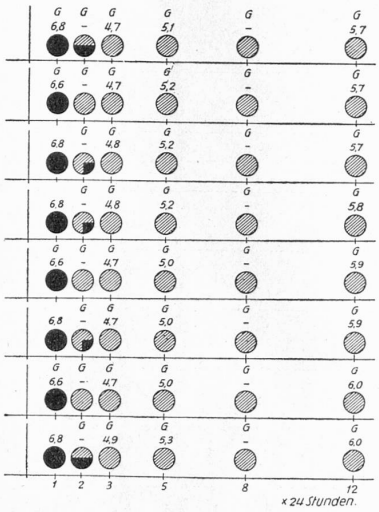
Agar I Paratyphus A-Beimpfung



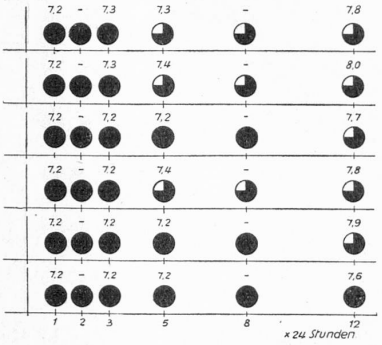
Agar I Paratyphus B-Beimpfung



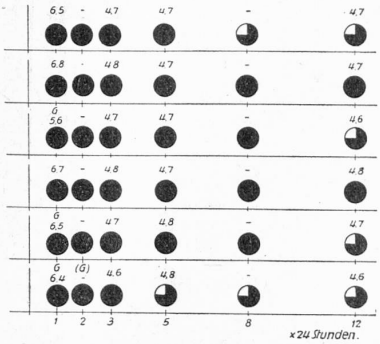
Agar II Coli-Beimpfung



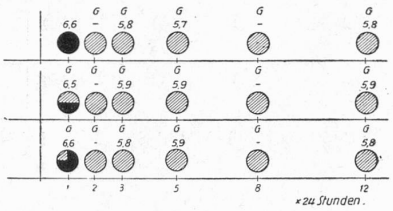
Agar II Coliform-Beimpfung



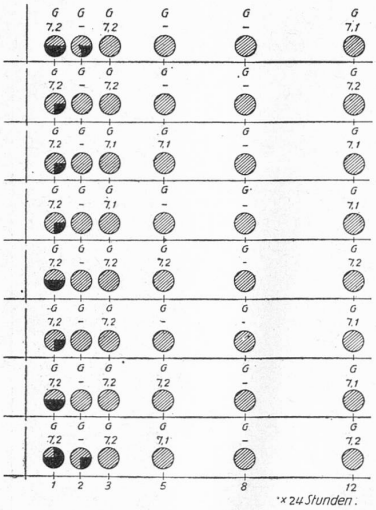
Agar II Typhus-Beimpfung



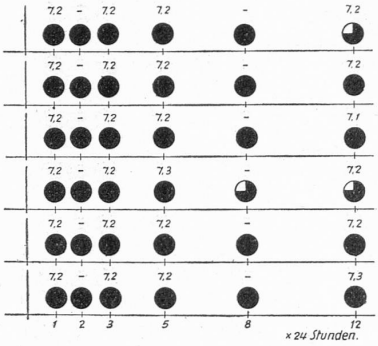
Agar II Paratyphus A-Beimpfung



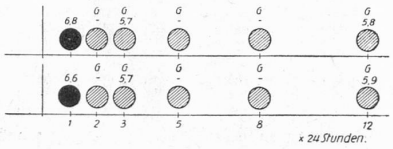
Agar III Coli-Beimpfung



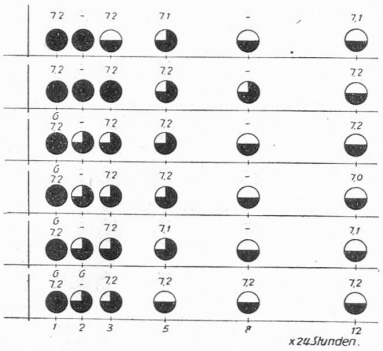
Agar III Coliform-Beimpfung



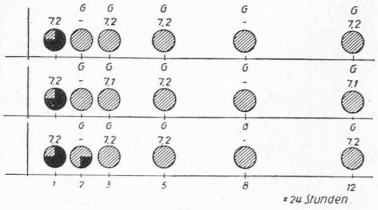
Agar II Paratyphus B-Beimpfung



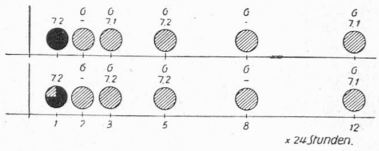
Agar III Typhus-Beimpfung



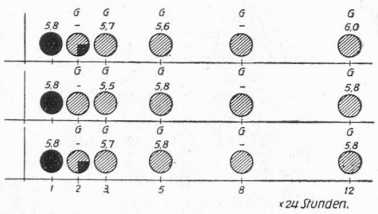
Agar III Paratyphus A-Beimpfung



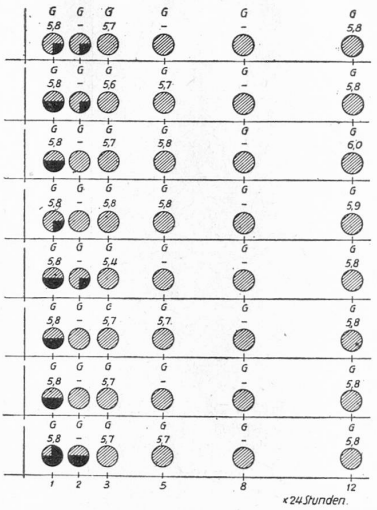
Agar III Paratyphus A-Beimpfung



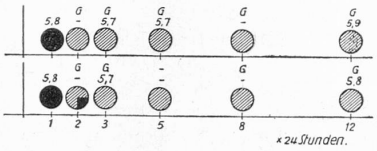
Agar IV Paratyphus A-Beimpfung



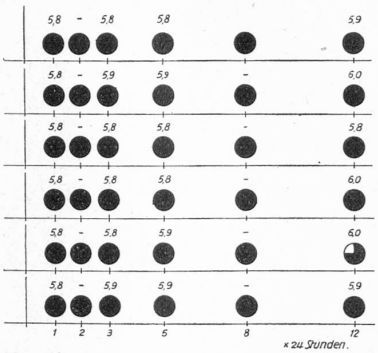
Agar IV Coliform-Beimpfung



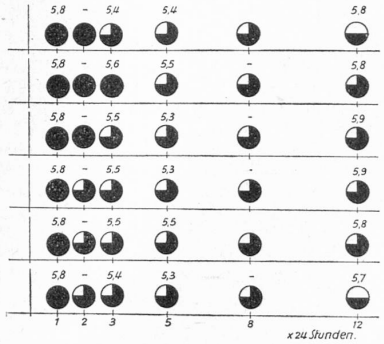
Agar IV Paratyphus B-Beimpfung



Agar IV Coliform-Beimpfung



Agar IV Typhus-Beimpfung



Kulturelles Verhalten der verschiedenen Agar-Nährsubstrate bei **COLI-Beimpfung**

9 verschiedene Stämme geprüft		**Agar I** gew.	**Agar II** 0,3 % Traubenzucker	**Agar III** 0,3 % Traubenzucker; pH = 7,2 gepuffert	**Agar IV** 0,3 % Traubenzucker; pH = 5,8 gepuffert
Neutralrot		entf. fluoresc. nach 1×24 Std. beginnend nach 2×24 Std. vollständig	entf. fluoresc. nach 2×24 Std. beginnend nach 3×24 Std. vollständig äusserst typische Verfärbung	entf. fluoresc. schon nach 1 × 24 Std. ziemlich fortgeschritten, nach 2 × 24 Stunden vollständig	entf. fluoresc. schon nach 1 × 24 Std. ziemlich fortgeschritten, nach 2 × 24 Stunden vollständig
Gasentwicklung		intensiv Agar zerklüftet, z. T. verflüssigt, schon meist nach 1 × 24 Stunden	intensiv Agar zerklüftet, z. T. verflüssigt, schon meist nach 1 × 24 Stunden	intensiv Agar zerklüftet, z. T. verflüssigt nach 1 × 24 Stunden	intensiv Agar zerklüftet, z. T. verflüssigt, nach 1 × 24 Stunden
pH-Verhältnisse	Stunden —	7,2	7,2	7,2	5,8
	1 × 24	7,1 (7,0—7,2)	6,8 (6,6)	7,2	5,8
	3 × 24	7,2 (7,1)	4,7 (—4,9)	7,2 (7,1)	5,7 (5,4—5,8)
	5 × 24	7,4 (7,2—7,4)	5,2 (5,0—5,3)	7,2 (7,1)	5,7 (5,8)
	12 × 24	7,8 (7,6—7,8)	5,8 (5,7—6,0)	7,1 (7,2)	5,8 (—6,0)

Kulturelles Verhalten der verschiedenen Agar-Nährsubstrate bei **COLIFORM**-Beimpfung

7 verschiedene Stämme geprüft		**Agar I** gew.	**Agar II** 0,3 % Traubenzucker	**Agar III** 0,3 % Traubenzucker; pH = **7,2** gepuffert	**Agar IV** 0,3 % Traubenzucker; pH = **5,8** gepuffert
Neutralrot		**nicht** entf. schwache Hellung nach 8—12 × 24 Stunden, besonders oben	**nicht** entf. schwache Hellung nach 8—12 × 24 Stunden, besonders oben	**nicht** entf. keine Hellung	nicht entf. keine Hellung
Gasentwicklung		keine	keine	keine	keine
pH-Verhältnisse	Stunden —	7,2	7,2	7,2	5,8
	1 × 24	7,2	7,2	7,2	5,8
	3 × 24	7,2 (7,3)	7,2 (7,3)	7,2	5,8 (5,9)
	5 × 24	7,3 (7,2—7,4)	7,3 (7,2—7,4)	7,2 (7,3)	5,8 (5,9)
	12 × 24	7,8 (7,5—7,9)	7,8 (7,6—8,0)	7,2 (7,1—7,3)	5,9 (5,8—6,0)

Kulturelles Verhalten der verschiedenen Agar-Nährsubstrate bei **TYPHUS-Beimpfung**

7 verschiedene Stämme geprüft		**Agar I** gew.	**Agar II** 0,3 % Traubenzucker	**Agar III** 0,3 % Traubenzucker; pH = 7,2 gepuffert	**Agar IV** 0,3 % Traubenzucker; pH = 5,8 gepuffert
Neutralrot		**nicht** entf. Hellung nach 2 × 24 Std., es bleibt ein orangebraun gelblicher Ton	**nicht** entf. ganz unbedeutende Hellung nach 12 × 24 Stunden	**nicht** entf. Hellung nach 2 × 24 Std., es bleibt ein orangebraun rötlicher Ton	**nicht** entf. Hellung nach 3—5 × 24 Stunden, es bleibt ein braunrötlicher Ton
Gasentwicklung		nicht bedeutend bei 2 Stämmen wenig Gasentwicklung nach 1 × 24 Stunden	nicht bedeutend bei 3 Stämmen wenig Gasentwicklung nach 1 × 24 Stunden	nicht bedeutend bei 4 Stämmen wenig Gasentwicklung nach 1 × 24 Stunden	keine
pH-Verhältnisse	Stunden —	7,2	7,2	7,2	5,8
	1 × 24	5,4 (5,3—5,6)	6,6 (6,5—6,8)	7,2	5,8
	3 × 24	6,7 (6,8)	4,7 (4,6—4,8)	7,2	5,5 (5,4—5,6)
	5 × 24	7,0 (6,9—7,1)	4,7 (4,8)	7,2 (7,1)	5,4 (5,3—5,5)
	12 × 24	7,2 (7,1—7,3)	4,7 (4,6—4,8)	7,2 (7,0—7,2)	5,8 (5,7—5,9)

Kulturelles Verhalten der verschiedenen Agar-Nährsubstrate bei **PARATYPHUS A-Beimpfung**

4 verschiedene Stämme geprüft		**Agar I** gew.	**Agar II** 0,3 % Traubenzucker	**Agar III** 0,3 % Traubenzucker; pH = 7,2 gepuffert	**Agar IV** 0,3 % Traubenzucker; pH = 5,8 gepuffert
Neutralrot		entf. fluoresc. nach 2 × 24 Stunden	entf. fluoresc. nach 2 × 24 Stunden	entf. fluoresc. nach 2 × 24 Stunden	entf. fluoresc. nach 2 × 24 Stunden
Gasentwicklung		vorhanden nicht durchwegs, nach 2 × 24 Std. beginnend	sehr intensiv Agarmasse wird ganz zerrissen und verliert fast jede Festigkeit, schon nach 1 × 24 Std. beginnend	intensiv nach 2 × 24 Stunden beginnend, Agar z. T. zerrissen	intensiv nach 2 × 24 Stunden beginnend, Agar z. T. zerrissen
pH-Verhältnisse	Stunden —	7,2	7,2	7,2	5,8
	1 × 24	5,4 (5,5)	6,6 (6,5)	7,2	5,8
	3 × 24	6,7 (6,6—6,8)	5,8 (5,9)	7,2 (7,1)	5,7 (5,5)
	5 × 24	6,8	5,9 (5,7)	7,2	5,8 (5,9)
	12 × 24	7,1 (7,0)	5,8 (5,9)	7,2 (7,1)	5,8 (6,0)

Kulturelles Verhalten der verschiedenen Agar-Nährsubstrate bei **PARATYPHUS B-Beimpfung**

3 verschiedene Stämme geprüft		**Agar I** gew.	**Agar II** 0,3 % Traubenzucker	**Agar III** 0,3 % Traubenzucker; pH = 7,2 gepuffert	**Agar IV** 0,3 % Traubenzucker; pH = 5,8 gepuffert
Neutralrot		entf. fluoresc. nach 2 × 24 Stunden	entf. fluoresc. nach 2 × 24 Stunden	entf. fluoresc. nach 2 × 24 Stunden	entf. fluoresc. nach 2 × 24 Stunden
Gasentwicklung		keine spurenweise vorhanden	sehr intensiv Agarmasse wird ganz zerrissen und verliert fast jede Festigkeit	intensiv nach 2 × 24 Stunden, Agar z. T. zerrissen	intensiv nach 2 × 24 Stunden Agar z. T. zerrissen
pH-Verhältnisse	Stunden —	7,2	7,2	7,2	5,8
	1 × 24	5,6 (5,5)	6,7 (6,6—6,8)	7,2	5,8
	3 × 24	6,7 (6,8)	5,7	7,2 (7,1)	5,8 (5,7)
	5 × 24	6,8 (6,9)	—	7,2	5,7
	12 × 24	7,1 (7,0—7,2)	5,8 (5,9)	7,1	5,8 (5,9)

Die Untersuchungsergebnisse*).

Die Neutralrot-Reaktion dürfte heute allgemein mit traubenzuckerhaltigen Nährmilieus ausgeführt werden. Dies geschah auch in den vorliegenden Versuchen. Durch gleichzeitige Prüfung von zwei weiteren Agar-Nährsubstraten von gleicher Zusammensetzung, die aber bei bestimmten pH-Werten gepuffert wurden sowie eines Nähragars ohne jeden Zusatz, wurde hier versucht, die grundlegenden kulturellen Bedingungen für das Eintreten der Reaktion abzuklären, ebenso die dabei auftretenden pH-Verhältnisse. Auf sämtliche bezeichneten Nährsubstrate wurden Bact. Coli und Typhus verimpft, die praktisch wohl am meisten Bedeutung haben dürften; daneben wurden aber zum Vergleiche auch die verwandten und nahestehenden Keime, nämlich Coliform (Gelatine nicht verflüssigendes, schwach bewegliches Kurzstäbchen, Endo positiv, Koser negativ) und Paratyphus A und B geprüft.

Wenn wir nun auf Grund dieser Versuchsergebnisse die Neutralrot-Reaktion und ihr Verhalten bei der verschiedenen Beimpfung beurteilen, so dürften sich einige typische Erkenntnisse ergeben.

Bei Coli-Beimpfung war die Reaktion in allen Nährsubstraten positiv; sie wurde auch durch Paratyphus A und Paratyphus B hervorgerufen, vielleicht mit dem Unterschiede, dass sie hier nicht so stürmisch (Gasentwicklung!) verlief und auch eine etwas weniger typische Verfärbung ergab. Für das Zustandekommen der Reaktion aber ist die Gasentwicklung nicht charakteristisch, indem auch andere, nicht positive Versuche Gas entwickelten. Allerdings zeigen jene Versuche, die eine äusserst typische Reaktion ergeben, auch eine sehr intensive Gasentwicklung; bei Coliform-Beimpfung, die auch in anderer Beziehung keine charakteristische Aenderung dieser Neutralrot-Milieus hervorruft, tritt überhaupt kein Gas auf. Typhus erzeugt eine minimale Gasentwicklung, während die Neutralrot-Reaktion negativ ist. Es stellt sich nun die Frage, ob die Gasentwicklung irgendwie im Zusammenhange mit der Umsetzung des Traubenzuckers steht. Da wir aber in traubenzuckerfreien Substraten auch Gasentwicklung finden und diese beim Zuckerzusatz nur intensiver auftritt, so scheint der Traubenzucker nur bedingte Bedeutung zu haben, umso mehr, als auch ohne diesen eine positive Neutralrot-Reaktion möglich ist. Allerdings wird das Auftreten der typischen Verfärbung mit Fluoreszenz besonders auffällig in den Kulturen mit Traubenzucker-Zusatz; gleichzeitig zeigen auch diese Versuche, ausgenommen natürlich die Nährsubstrate, die gepuffert sind, ein Absinken des pH-Wertes bis 4,7. Da anderseits die Versuche ohne diesen Zusatz nur vorübergehend unter den pH-Wert von 7,2 gehen, so ist anzunehmen, dass im Traubenzucker die säureliefernde Substanz zu suchen ist. Als solche käme wohl

*) Wir treten in diesem Zusammenhang nicht mehr näher auf die Versuche 1, 2 und 3 ein, weil diese in der vorliegenden Darstellung für sich sprechen.

sonst nur noch der Liebigs Fleischextrakt in Frage, der aber in gleicher Menge zu allen Nährsubstraten verwendet wurde. Man kann sich natürlich die Frage stellen, ob in den traubenzuckerfreien Substraten nicht Stoffe des Liebigs Fleischextraktes die Funktion dieses Zuckers übernehmen können und so die Neutralrot-Reaktion überhaupt ermöglichen. — Durch dieses Verhalten der pH-Werte bei gleichzeitigem Auftreten der typischen Neutralrot-Reaktion (wie Coli im Traubenzucker-Nähragar) gelangen wir nun aber in die von Clark bei der Neutralrot-Reaktion zur Bildung der grünen Fluoreszenz geforderten äusserst günstigen Bedingungen (pH = 5,3). Damit hätten wir auch eine Erklärung, weshalb die Reaktion im Traubenzucker-Nährboden so typisch eintritt. Schon aus diesem Grunde sollte deshalb der Zusatz von Traubenzucker bei der Neutralrot-Reaktion in praxi Verwendung finden.

Nun ist aber die saure Phase für das Eintreten der Reaktion nicht ausschlaggebend, was schon *Guerbet*[2]) bewiesen hat. Typhus z. B. bewirkt im Traubenzucker-Nähragar auch ein Fallen des pH bis 4,7, ohne aber das charakteristische Potential von Neutralrot zu erzeugen. Man muss annehmen, dass diese pH-Aenderung dem Traubenzucker zuzuschreiben ist, da ohne diesen kein merkliches und bleibendes Absinken des pH-Wertes zu beobachten ist.

Durch Verwendung von gepufferten Nährsubstraten wurde untersucht, ob das Auftreten der positiven Neutralrot-Reaktion an ganz bestimmte pH-Bereiche gebunden ist. Dem ist aber nicht so. Wir sehen, dass die gepufferten Nährsubstrate sich von dem entsprechenden, nicht gepufferten Traubenzucker-Nähragar prinzipiell nur durch die Art des Verlaufes der pH-Aenderung unterscheiden: die Neutralrot-Reaktion ist auch in diesen Milieux möglich. Dies stimmt auch mit den chemischen Befunden von Clark überein, wobei die Reduktion von Neutralrot und das Auftreten dieser typischen Fluoreszenz nicht an einen ganz bestimmten pH-Bereich gebunden ist; sie tritt nur ganz charakteristisch auf innerhalb eines bestimmten Bereiches. *Geilinger* und *Schweizer*[4]) suchten in ihren Versuchen durch Variieren des Zusatzes — sie verwendeten auch andere Zuckerarten und verwandte Stoffe — die hiebei auftretende Art des pH-Wertverlaufes abzuklären. Nun sehen wir aber am Traubenzucker-Nähragar mit Typhus-Beimpfung, dass der günstige pH-Bereich wohl vorhanden sein kann, die Neutralrot-Reaktion aber nicht eintritt. Wir können also wohl günstige pH-Verhältnisse vorfinden; wenn aber die erforderlichen rH-Verhältnisse nicht vorliegen, kann die Reaktion doch nicht eintreten. Die Reduktionsprozesse in den untersuchten bakteriologischen Nährsubstraten erreichten nur bei Coli und Paratyphus A und B das Potential, das der zugehörigen Farbänderung des Neutralrotes entspricht. Die reduzierten Stoffe, die bei der positiven Reaktion gebildet werden, können vielleicht als für die Gasbildung besonders präformiert in Frage kommen, was speziell bei der Zersprengung der

Agarschicht und bei der gleichzeitigen Verflüssigung einzelner Agarteile zum Ausdruck kommt.

Was die Versuche von *Geilinger* und *Schweizer* anbetrifft, so sind diese in flüssigen Nährsubstraten ausgeführt worden und unter anaeroben Bedingungen. Auch ihre Versuche bestätigen, dass bei Anaerobiose niemals Fluoreszenz auftritt. In Bezug auf unsere Untersuchungen zeigt Paraffin-Ueberschichtung nur beschränkte anaerobe Bedingung. Für alle weitern Versuche wurden daher die betreffenden Nährsubstrate mit Agar-Zusatz verwendet; dies schien uns gerechtfertigt, weil dadurch einheitliche Bedingungen geschaffen wurden.

Wir sehen eigentlich bei allen beimpften Nährsubstraten ein Absinken des pH-Wertes während der ersten Tage. Bei den gepufferten Nährsubstraten ist die Säurebildung (eventuell Alkalibildung) zu gering, um hier den ursprünglichen pH-Wert überhaupt tiefgreifend zu verändern. Dagegen zeigen die nicht gepufferten Nährsubstrate und hier besonders bei Traubenzucker-Zusatz ein Absinken des pH-Wertes. Diese Erscheinung ist vor allem typisch bei Typhus- und Paratyphus-, A- und B-Beimpfung, während Coliforme überhaupt keine Veränderung hervorbringen und Coli-Beimpfung den pH-Wert nur im Traubenzucker-Nähragar herabsetzt, um hier dann allerdings auch die weitaus typischste Reaktion zu ergeben. Nach drei Tagen erreicht hier die Wasserstoffionenkonzentration einen pH-Wert von 4,7, nähert sich dann aber wieder dem Neutralpunkt. Sonst gibt nur noch Typhus einen solch tiefen pH-Wert, ohne dabei aber überhaupt eine positive Neutralrot-Reaktion zu zeitigen. Paratyphus A und B, die wie Coli positive Reaktion auslösen, zeigen im Traubenzucker-Nähragar ähnlichen Verlauf wie Coli, erreichen aber nicht so tiefe Werte, dagegen erniedrigen sie den pH-Wert auch im gewöhnlichen Nähragar. — Danach muss angenommen werden, dass kein direkter Zusammenhang zwischen der Wasserstoffionenkonzentration und dem Eintreten der Reaktion vorliegt; auf die indirekten Beziehungen wurde bereits hingewiesen. Wenn wir den Liebigs Fleischextrakt und den Traubenzucker als säureliefernde Substanzen annehmen, so sehen wir doch durchwegs, dass bei den entsprechenden Traubenzucker-Nährsubstraten der pH-Wert stärker erniedrigt wird.

Im allgemeinen dürfte zwar Säurebildung in den Kulturen wachstumshemmend wirken; für Bact. Coli wird angenommen, dass bei einem pH-Wert von 6,0 sein Wachstum noch kaum beeinträchtigt wird[8]). Durch Verwendung des gepufferten Nährsubstrates von pH = 5,8 konnte gezeigt werden, dass bis zu diesem pH-Bereich ein Unterschied in dieser Hinsicht kaum vorhanden ist, indem eine positive Neutralrot-Reaktion noch eintritt.

Während nun nach der Beimpfung der Nährsubstrate die pH-Werte eher absinken, so sehen wir, dass im Alter bei allen Kulturen eher das

[8]) *Dernby,* La concentration optima en ions hydrogène favorisant le développement de certains micro-organismes, Ann. Inst. Pasteur, **35** ,287 (1921).

entgegengesetzte Verhalten zu konstatieren ist. Die Reaktion sollte deshalb nach nicht zu langer Zeit beurteilt werden. *Geilinger* und *Schweizer* beobachteten das Eintreten der Reaktion meistens schon nach 24 Stunden; unsere Versuche sind am zuverlässigsten nach 2—3×24 Stunden zu beurteilen. Diese Unterschiede dürften wohl durch die Ueberimpfungsmenge bedingt sein: bei unsern Versuchen wurden verhältnismässig geringe Mengen von Bakterien überimpft, die für den praktischen Fall nur ausnahmsweise so klein sein dürften. Durch Einbringung grösserer Impfmengen konnte bewiesen werden, dass die Reaktion entsprechend früher eintritt.

Wenn wir den benutzten Traubenzucker-Zusatz mit jenen und im speziellen mit den Traubenzucker-Zusätzen, die *Geilinger* und *Schweizer* gemacht haben, vergleichen, so erkennen wir, dass der Zusatz von 0,3% ein günstiger ist. Die Autoren setzten 0,2% und 0,5% zu; mit den von uns gewählten 0,3% konnte aber schon der gleich tiefe Abfall des p_H-Wertes erreicht werden, den jene erst mit 0,5% erreichten.

Wenn wir den Farbumschlag bei der positiven Neutralrot-Reaktion beurteilen, so können wir sagen, dass diese Reaktion in den Versuchen mit Traubenzucker-Nähragar bei Coli-Beimpfung typisch auftrat. Es scheint, dass hier die Verfärbung viel stärker ist, auch treten die Nebenerscheinungen, wie Gasentwicklung und Agarverflüssigung, viel intensiver auf. Ausser der typisch kanariengelben Farbe mit Fluoreszenz beobachten wir besonders bei den Typhus-Stämmen eine Farbänderung, die sich speziell durch Aufhellung bemerkbar macht. Diese hat aber mit der eigentlichen Neutralrot-Reaktion nichts zu tun: das Auftreten eines gelb-rötlichen Tons ist verschieden von der Bedeutung der typisch kanariengelben Farbe und ist die Reaktion von Neutralrot als Säure-Base-Indikator in seinem Umschlagsintervall von 6,8—8,0. Diejenigen Versuche, die p_H-Werte unter 6,8 aufweisen, zeigen denn auch nur eine unmerkliche Hellung (wie Traubenzucker-Nähragar und gepufferter Traubenzucker-Nähragar $p_H = 5{,}8$); das Auftreten einer hellgelb-orangefarbigen Veränderung wird bei Versuchen mit p_H-Werten über 6,8 beobachtet (gew. Nähragar und gepufferter Traubenzucker-Nähragar $p_H = 7{,}2$).

Bei praktischen Untersuchungen müssen wir darauf bedacht sein, dass nicht von aussen her die erforderlichen r_H- und p_H-Verhältnisse durch das Impfgut an sich schon zu Bedingungen führen, die die Neutralrot-Reaktion grundlegend beeinträchtigen.

Wenn die Neutralrot-Reaktion auch nicht als streng spezifisch in der Coli-Typhus-Gruppe zu betrachten ist, so ergibt sich aus unsern Untersuchungen doch, dass ihr in der von uns angegebenen Arbeitsweise eine nicht zu unterschätzende Bedeutung zur Differenzierung von Coliformen und Typhus gegenüber reinen Coli-Stämmen durchaus zukommt.

Zusammenfassung.

Es wurden systematisch Coli, Coliforme, Typhus und Paratyphus A und B, als typische Vertreter dieser Bakteriengruppe, in folgenden Nährsubstraten geprüft: gewöhnlicher Nähragar, Traubenzucker-Nähragar (als wohl meistens für diese Versuche gebraucht) und Traubenzucker-Nähragare, die bei gewissen pH-Werten gepuffert waren (pH = 7,2; pH = 5,8). Durch gleichzeitige Prüfung der pH-Werte wurde der Zusammenhang zwischen dem Eintreten der Reaktion und der entsprechenden Wasserstoffionen-Konzentration abgeklärt.

Es zeigte sich nun, dass die pH-Werte wohl fallen können (wie bei Typhus), die Neutralrot-Reaktion aber nicht eintritt: die erforderlichen rH-Verhältnisse sind dann nicht erfüllt. Zwar zeigen auch Paratyphus A und B eine positive, fluoreszierende Reaktion des Neutralrotes; die Reaktion ist aber nur mit Coli in Traubenzucker-Nähragar wirklich typisch. Hier sind die Oxydations-, Reduktion- und gleichzeitig auch die pH-Bedingungen erfüllt, die die charakteristische Verfärbung des Neutralrotes zur Voraussetzung haben.

Die Neutralrot-Reaktion hat zum Differenzieren von Coli gegen Coliform und Typhus grosse praktische Bedeutung; sie darf heute als Ausdruck bestimmter Oxydations-Reduktions-Zustände angesprochen werden.

Lichtelektrische Bestimmung von Furfurol und Methylalkohol.

Von Dr. H. MOHLER und Dr. H. BENZ.

(Mitteilungen aus dem Chemischen Laboratorium der Stadt Zürich.)

Lichtelektrisches Colorimeter.

Bei der Leistung des Auges zur Ermittlung von Farbunterschieden lässt sich nach *N. E. Pestow*[1]) zunächst eine Periode der Anpassung, die 1 bis 2 Sekunden dauert, unterscheiden, in der die Empfindlichkeit des Auges gegenüber dem betreffenden Farbton ansteigt, worauf eine Periode der höchsten Empfindlichkeit von einer Dauer von 3 bis 6 Sekunden (seit Beobachtungsbeginn) folgt. Schliesslich tritt eine Periode ein, in der das Auge zu ermüden beginnt (6 bis 7 Sekunden seit Beobachtungsbeginn) und in der seine Empfindlichkeit merklich abnimmt. Zu seiner Regenerierung braucht das Auge eine Pause von 5 bis 15 und mehr Sekunden, je nach dem Grade der Ermüdung. Zu diesen Schwierigkeiten kommt noch die individuelle Eigenheit des linken und des rechten Auges, sowie ganz allgemein eine unzureichende Empfindlichkeit des Auges gegenüber geringfügigen Farbunterschieden, die mit der Farbintensität zunimmt. Die physiologischen Nachteile des

[1]) Z. anal. Chem., **89**, 9 (1932).