II. Aus dem Laboratorium der I. medicinischen Universitätsklinik in Berlin.

(Direktor: Geh. Med.-Rath Prof. Dr. E. v. Leyden.)

Zur Chemie der Bakterien.¹⁾

Von Dr. Ernst Bendix, Volontärassistenten der Klinik.

Durch die Forschungen der letzten Jahre ist festgestellt worden, dass die niedrigsten der uns bis jetzt bekannten Lebewesen, die Bakterien, in ihren Lebensprozessen dennoch so manche Gemeinsamkeit mit den höher organisirten Pflanzen und Thieren aufweisen. Namentlich auch die Frage nach der Zellennatur der Bakterien, d. h. ob in denselben sich Plasma- und Kerngebilde unterscheiden lässt, ist letzthin Gegenstand lebhafter wissenschaftlicher Controverse geworden. In diesen Bestrebungen, aus dem allgemeinen Eiweiss der Bakterien die Kerneiweisse zu differenziren, begegnen sich Morphologie und Chemie. Die Morphologen suchten vermittels der den Nukleinen eigenthümlichen Farbreaktionen den Kernnachweis in den Bakterien zu führen, und die physiologischen Chemiker versuchten durch Darstellung der spezifischen Kernsubstanzen, beziehungsweise ihrer Abbauprodukte die Frage zu lösen. So z. B. stellte Togasaka Nishimura (1) aus Bakterien die Nukleinbasen (Xanthin, Guanin, Adenin) dar, und Gino Galeotti (2) stellte aus Bakterien nach der Methode von Hammarsten die Nukleoproteide rein dar. Es fehlte bisher jedoch noch der Nachweis, eines für die meisten — vielleicht alle — Nucleoproteide charakteristischen Bestandtheils, nämlich der Pentosen. In fast allen der bisher untersuchten Pflanzen- und Thiernukleine ist der Nachweis dieser typischen Kohlehydratgruppe gelungen. Kossel (3) wies Pentose in der Hefe nach, und Hammarsten (4), Salkowski (5), Blumenthal (6), Bergell und Jacob (7), Bang (8), Neumann (9), Wohlgemuth (10), konnten den Pentosen-Nachweis für die Nukleine der von ihnen untersuchten thierischen Organe beibringen.

Es erschien daher von Interesse, auch in den Bakterien nach diesem integrierenden Nucleoproteid-Bestandtheil zu fahnden. Bei der Schwierigkeit der Beschaffung der zu diesen Untersuchungen nöthigen Menge des Ausgangsmaterials habe ich bisher in Reinkulturen nur Tuberkelbacillen zu untersuchen Gelegenheit gehabt, sodann aber auch Bakteriengemische verschiedener Art.

In den Tuberkelbazillen ist ebenso wie in anderen Bakterien das Vorkommen von Kohlehydraten schon mehrfach behauptet worden, ohne dass aber bisher eine Einigung über die Art des Kohlehydrates erzielt worden ist. Hammerschlag (11) glaubte in den Tuberkelbazillen Cellulose gefunden zu haben, ein Befund, der von Togasaka Nishimura (1), dem oben erwähnten Schüler Rubner's, dagegen nicht bestätigt werden konnte. Dieser Forscher isolirte aber in einer anderen Bakterienart ein Kohlehydrat, dessen elementare Analyse der Formel $C_6H_{10}O_5$ am ehesten entsprach, wobei aber zu bemerken ist, dass der C-Gehalt für diese Formel ein zu niedriger war. Letzthin hat C. Helbing (12) (in Uebereinstimmung mit Ruppel) sich auf Grund von Farbreaktionen dahin ausgesprochen, dass die Tuberkelbazillen Chitin und demgemäss Glukosamin als Kohlehydrat enthalten. Ebenso glaubten Nencki und Schaffer (13), dass in den von ihnen untersuchten Bakterien ein N-haltiges Kohlehydrat enthalten sei.

Um in den mir von anderen Untersuchungen her zur Verfügung stehenden Tuberkelbazillen das darin enthaltene Kohlehydrat zu bestimmen, verfuhr ich folgendermaassen: Die Bazillen wurden mit destillirtem Wasser, Aether, Alkohol ausgewaschen

¹⁾ Nach einem Vortrage im Verein für innere Medicin am 10. Dezember 1900.

und getrocknet. Das solcherart erhaltene Ausgangsmaterial war ein feines graues Pulver, das ich zur weiteren Untersuchung in zwei Theile theilte. In dem ersten Theil wurde aus dem ganzen Bakterienleib als solchem die Abspaltung der Kohlehydratgruppe vorgenommen: das Pulver wurde in ein Becherglas gebracht und eine kurze Zeit lang (ca. 20 Minuten) mit 5% Salzsäure auf freier Flamme erhitzt, bis die Flüssigkeit einen fleischfarbenen Ton annahm. Eine Probe dieses Filtrates ergab eine deutliche Trommersche Reaction. Die Flüssigkeit wurde sodann nach dem Erkalten unter Eiskühlung vorsichtig bis zur schwachalkalischen Reaction mit Natronlauge versetzt und sofort wieder mit Essigsäure angesäuert. Nachdem nun die ungelösten Bestandtheile durch Filtriren entfernt waren, wurde nach Hinzufügung von etwas Phenylhydrazin in gewöhnlicher Weise die Osazonbildung durch $1\frac{1}{2}$ -stündiges Kochen auf dem Wasserbade vorgenommen.

Das Osazon, welches sich bildete, war in heissem Wasser leicht löslich und zeigte nach mehrfachem Umkrystallisiren aus heissem Wasser den für die Pentosazone charakteristischen Schmelzpunkt von 153 bis 155°. Zur weiteren Charakterisirung des in den Tuberkelbazillen vorkommenden Kohlehydrates als Pentose wurde auch die Orcin-Salzsäure-Probe herangezogen: dieselbe ist nach Salkowski's (9) und Blumenthal's (10) Untersuchungen mit besonderem Vortheil hierbei zu verwenden und hat auch jüngsthin Bial (14) zur Feststellung seiner beiden Pentosuriefälle gute Dienste geleistet. Ich verfuhr daher in derselben Weise: Kleine Quantitäten des Pulvers wurden mit einigen Körnchen Orcin und etwas concentrirter Salzsäure versetzt, und dieses Gemisch kurze Zeit gekocht. Dabei zeigte sich eine Grünfärbung der Flüssigkeit, und der amlalkoholische Auszug gab bei der spektroskopischen Untersuchung den für Pentosen als typisch beschriebenen Absorptionsstreifen am Ende des Roth zwischen C und D. Ich fand ebenso an dem aus den Bakterien dargestellten, oben beschriebenen Pentosazon, den Vorschriften von P. Mayer und Blumenthal (6) entsprechend, bei Anstellung der Orcin-Salzsäurereaktion die für die Pentosazone als charakteristisch beschriebenen spektroskopischen Erscheinungen. Aus alle diesem geht mit Sicherheit hervor, dass das in Frage stehende Kohlehydrat eine Pentose ist.

Um nun weiter den Beweis zu erbringen, dass, den oben erörterten Erwägungen gemäss, das Nucleoproteid der Träger des Pentosen-Radikals sei, stellte ich aus dem Rest des Bakterienpulvers, den Vorschriften Hammarsten's im wesentlichen folgend, ein Nucleoproteid dar. Zu dem Ende wurden die Tuberkelbazillen mit etwa $\frac{1}{10}$ Normal-Natronlauge im Porzellanmörser verrieben, sodann dieses Gemenge kurze Zeit auf 60 bis 70° erwärmt und in eine dünne Essigsäurelösung filtrirt. In der essigsäuren Lösung entstand ein sehr voluminöser, flockiger, weisser Niederschlag, welcher auf einem gehärteten Filter gesammelt und nach Auswaschen mit Alkohol und Aether auf einer Thonplatte zum Trocknen gebracht wurde. Die getrocknete Substanz erwies sich ausser nach ihrer Darstellungsweise aus folgenden Eigenschaften als Nucleoproteid: Sie war unlöslich in Wasser, Säuren, Alkohol, Aether, leichtlöslich in Alkalien, verhielt sich gegen künstlichen Magensaft resistent und war stark phosphorhaltig. Die Nukleinnatur der Substanz erscheint auch so genügend gesichert, ohne dass (wegen des unzureichenden Materials) die quantitative Analyse auf N und P angestellt wurde. Die kleinsten Körnchen dieses Nucleoproteids gaben nun eine ausserordentlich starke Pentosenreaction. Damit ist unsere Vermuthung gerechtfertigt, dass das Nucleoproteid der Tuberkelbazillen Träger der Pentosengruppe ist. Hieraus folgt, dass die Tuberkulinpräparate das Pentosenradikal nicht enthalten.

Ausser in den Tuberkelbacillen untersuchte ich noch die Kohlehydratgruppe einer Mischkultur von Fäkalbakterien in genau analoger Weise. Das Ausgangsmaterial gewann ich in diesem Falle in der Weise, dass ich mir einen Nährboden construirte, welcher im Gegensatz zu den gewöhnlichen Nährböden für Bakterien frei von Pentosanen und Nukleinen war: Einige Liter normalen Harnes, welcher nach längerem Stehen an der Luft eine leicht alkalische Reaction angenommen hatte, wurde mit geringen Mengen von Pepton und Traubenzucker versetzt und nach Sterilisation im Koch'schen Topfe mit Fäkalbakterien geimpft. Nach etwa 8 bis 14 Tagen wurden die Bakterien, welche sich in Haufen auf dem Boden der Gefässe angesammelt hatten, gesammelt und in ihnen in der eben beschriebenen Weise der Pentosennachweis geführt.

Aus diesem zweiten Versuch geht hervor, dass die Bakterien genau wie hochorganisirte Pflanzen im Stande sind, aus verhältnissmässig einfachen Körpern hochconstituirte Verbindungen, wie z. B. Nukleine synthetisch zu bilden.

Durch Anstellen der Pentosenreaction mit kleinen Quantitäten anderer Bakterien kann man sich überzeugen, dass auch viele andere Bakterien, z. B. Diphtheriebazillen, Nukleine, bezw. Pentosane enthalten. Bei anderen dagegen, z. B. Typhusbazillen, fiel die allerdings noch nicht genügend oft angestellte Pentosenreaction negativ aus. Vielleicht gelingt es mit Hilfe dieser chemischen Reaction, je nach ihrem positiven oder negativen Ausfall, morphotisch gleichwerthige Bakterien zu differenziren, worüber Versuche im Gange sind.

Litteratur.

1. Togosaka Nishimura, Archiv für Hygiene Bd. XVIII, S. 318.
- 2. Gino Galeotti, Zeitschrift für physiologische Chemie 1898, Bd. XXV.
- 3. Kossel, Du Bois' Archiv für Physiologie 1892 und 1893.
- 4. Hammarsten, Zeitschrift für physiologische Chemie 1894, Bd. XIX.
- 5. Salkowski, Zeitschrift für physiologische Chemie Bd. XXVII.
- 6. Blumenthal, Berliner klinische Wochenschrift 1897, Bd. XII. Zeitschrift für klinische Medicin Bd. XXIV, Heft 1 und 2. Zeitschrift für klinische Medicin Bd. XXXVII, Heft 5 und 6.
- 7. Bergell und Jacob, Zeitschrift für klinische Medicin.
- 8. Bang, Deutsche medicinische Wochenschrift 1897, No. 21.
- 9. Neumann, Sitzungsberichte der physiologischen Gesellschaft zu Berlin.
- 10. Wohlgemuth, Berliner klinische Wochenschrift 1900.
- 11. Hammerschlag, Centralblatt für klinische Medicin 1891, Bd. I.
- 12. C. Helbing, Deutsche medicinische Wochenschrift 1900, No. XXIII.
- 13. Nencki und Schaffer, Journal für praktische Chemie Bd. XX.
- 14. Bial, Zeitschrift für klinische Medicin Bd. XXXIX, Heft 5 und 6.