

Über die a-nucleinsaures Natron lösende Wirkung einiger Mikroorganismen.

Von

H. Plenge.

(Aus dem physiolog. Institut Heidelberg. Vorgetragen im naturhistorisch-medizinischen Verein Heidelberg am 3. Juli 1903.)

(Der Redaktion zugegangen am 1. Juli 1903.)

Nachdem Araki (1903) seine Arbeit «über die enzymatische Zersetzung der Nucleinsäure» im hiesigen Institut beendet und gefunden hatte, daß Trypsin, Erepsin und in Organextrakten der Thymus, Leber, Milz enthaltene Fermente imstande sind, die Nucleinsäure aus der a- in die b-Form überzuführen und mehr oder weniger weit zu zerlegen, schlug Herr Prof. A. Kossel mir vor, die Frage in der Weise weiter zu verfolgen, daß ich die gelatinierende a-Nucleinsäure als Nährboden für Bakterien und andere Mikroorganismen benütze und prüfe, ob diese imstande seien, die Nucleinsäure ähnlich wie die Gelatine zu verflüssigen.

Ich bin ihm für die Anregung zu diesem, wie sich zeigen wird, ergebnisreichen Versuch zu großem Dank verpflichtet und ebenso für ein im hiesigen Institut nach der Vorschrift von A. Neumann (1899) hergestelltes Präparat von a-nucleinsaurem Natron. Es löst sich in Wasser beim Erwärmen mit völliger Klarheit und Durchsichtigkeit und erstarrt in 5⁰/iger Lösung, wie es A. Neumann (1899) angibt, zu einer festen Gallerte. Bei mehrfachem, anhaltendem Sterilisieren im Kochschen Dampftopf büßt es sein Erstarrungsvermögen nicht ein; auch nicht, wenn man vorher die an sich leicht alkalische Reaktion durch Hinzufügen von etwas kohlen-saurem Natron verstärkt, doch tritt dabei manchmal eine leichte Trübung auf. Die erstarrte Lösung bleibt bei Brutschranktemperatur von 37—40⁰ fest, über 40⁰ beginnt sie flüssig zu werden, wird bei 50⁰ ganz flüssig

und beginnt beim Abkühlen bei etwa 42° zu erstarren. Lösungen von geringerem Prozentgehalt in reinem Wasser erstarren bei Zimmertemperatur nicht mehr vollständig: 2,5% gibt nur eine stark zitternde Gallerte. Wohl aber erstarren 2,5%ige Lösungen, wenn man sie nicht mit reinem Wasser, sondern mit Fleischwasserpeptonbouillon herstellt, oder der Wasserlösung 0,5% Kochsalz hinzufügt. Auch diese salzreichen Lösungen bewahren ihr Erstarrungsvermögen nach dem Sterilisieren, doch hält die nur mit NaCl versetzte Lösung die Brutschranktemperatur nicht aus, ohne stark zitterig bis flüssig zu werden, während die mit Fleischwasserpeptonbouillon hergestellten Nährböden bei 37° vollkommen genügend festbleiben, sowohl in Reagierzylindern als in Petri-Schälchen ausgegossen. Bei der Bereitung der Lösungen auftretende oder durch anhaftende Papierfäserchen bedingte Trübungen lassen sich mit dem Heißwassertrichter leicht abfiltrieren: auch die 5%ige Lösung läuft glatt durch das Filter, so daß wir in dem a-nucleinsäuren Natron einen festen Nährboden haben, der an Durchsichtigkeit und Klarheit Gelatine und Agar weit übertrifft und sich mit viel geringerer Mühewaltung herstellen läßt. Nur muß man Rücksicht darauf nehmen, daß der dem Präparat etwa noch anhaftende Alkohol bei der Herstellung genügend verdunsten kann. Ich habe damit keine Schwierigkeiten gehabt. Dazu bietet das a-nucleinsäure Natron den Mikroorganismen, speziell den pathogenen, einen Stoff, der ein direkter Abkömmling der in der Zelle bezüglich im Kern enthaltenen Substanzen ist, während selbst die Gelatine, die wohl außer dem Blutserum allein von den sonst üblichen festen Nährböden zugleich als Nahrungsmittel in Betracht kommt, nur aus den Zwischenzellsubstanzen stammt. Weiterhin können wir auch im Brutschrank, also bei jedem Temperaturoptimum, auf Verflüssigung prüfen.

Zu den ersten Versuchen stand mir ein leuchtender *Elbvibrio* aus Hamburg in zwei verschiedenen Originalkulturen zur Verfügung, den wir zu Vorlesungszwecken benutzt haben, für dessen Übersendung ich Herrn Prof. Dunbar zu Dank verpflichtet bin. Dieser *Vibrio* eignete sich zu den Vorversuchen besonders gut, da er durch sein Leuchten ein sehr einfach zu

beobachtendes und unverkennbares Zeichen seiner Reinheit, Lebensfähigkeit und seines Wachstums gab. Es zeigte sich bald, daß der *Vibrio* auf 5%iger Gallerte von a-nucleinsaurem Natron in destilliertem Wasser (Strichkultur auf schräg erstarrtem Nährboden) sich gut entwickelte und wuchs, wenn auch etwas langsam, daß er leuchtete und sogar scheinbar verloren oder zurückgegangenes Leuchtvermögen (Kultur von 93) in ausgiebiger Weise wiedergewann und länger bewahrte als gleichzeitig auf Bouillonagar oder -Gelatine gezogene Kulturen, vielleicht infolge des hohen Phosphorgehaltes; endlich, daß er, wie die Gelatine, auch das nucleinsaure Natron verflüssigt und sich an der Oberfläche des flüssigen Nährbodens ansammelt.

Hiermit waren in den ersten Tagen des Mai dieses Jahres die Hauptfragen gelöst; es war bewiesen erstens: daß sich das a-nucleinsaure Natron in Wasser gelöst als Nährboden eigne, die Lebensäußerungen der verimpften Bakterien nicht hindere oder wesentlich abändere, zweitens: daß gewissen Bakterien die Fähigkeit zukommt, das a-nucleinsaure Natron so zu verändern, daß es sein Erstarrungsvermögen verliert.

Dieser Erfolg war in keiner Weise mit Sicherheit vorauszusehen, denn nach mehreren früheren Untersuchern, Hankin, Christmas, Bitter, Vaughan (cit. bei H. Kossel 1894) gelten gewisse Bestandteile des Zellkerns, die zum Teil als Nuclein bezeichnet wurden, als baktericid. Ähnliches schienen die Arbeiten von Brieger, Kitasato, Wassermann (cit. bei H. Kossel 1894) mit Auszügen zellenreicher Organe besonders der Thymus zu ergeben. Dann hat H. Kossel (1894) für die Nucleinsäure aus der Kalbsthymus die baktericide Wirkung in einwandfreier Weise festgestellt. Er brachte sie mit der eiweiß-fällenden Eigenschaft der Nucleinsäure in Beziehung. Dies Vermögen kommt dem Natronsalz der a-Nucleinsäure nicht zu und so ist es vielleicht zu erklären, daß diese Säure keine baktericide Wirkung hat, so lange die Lösung, oder der feste Nährboden durch fixe Alkalien alkalisch bleibt.

Die nächsten Fragen waren erstens: wie verhalten sich die übrigen Bakterien und andere Mikroorganismen? Zweitens:

gehen die Fähigkeiten, Gelatine oder a-nucleinsaures Natron zu verflüssigen, einander immer parallel, wird die Verflüssigung, wenn überhaupt durch ein Enzym, durch das gleiche bedingt, oder gibt es Mikroorganismen, die nur eines von beiden verflüssigen, das andere anzugreifen aber nicht fähig sind? Ich verdanke der Freundlichkeit der Herren im hiesigen pathologisch-anatomischen Institut, besonders des Herrn Dr. W. Hofmann, 25 verschiedene Arten, an denen ich die Fragen prüfen konnte.

Um möglichst gleiche Bedingungen für beide zu vergleichende Nährböden, Gelatine und a-nucleinsaures Natron, zu schaffen, habe ich zunächst das a-nucleinsaure Natron nur als Erstarrungsmittel verwendet und zu 2,5% in der gleichen Fleischwasser-pepton-bouillon gelöst, mit der ich die (wegen der zu erwartenden höheren Sommer-Temperaturen) 10%ige Nährgelatine hergestellt habe. Nach vorschriftsmäßiger Sterilisation wurden unmittelbar hintereinander von denselben Originalkulturen je ein oder zwei Gelatine- und a-nucleinsaures Natron-Röhrchen durch Stich geimpft und in einem geräumigen verschlossenen Schranke bei Zimmertemperatur gehalten. Das im Schranke aufgehängte Thermometer zeigte im allgemeinen 18—20 oder 21°, stieg nur in den heißen Tagen anfang Juli auf 22 und einmal auf 23° C. an. Die Gelatine blieb bei diesen Temperaturen fest. Eine bemerkenswerte Austrocknung fand in aufgestellten, nicht besäten Kontrollröhrchen nicht statt.

Die Ergebnisse dieser Vergleichsreihen, die ich in der nebenstehenden Tabelle S. 198 niedergelegt habe, waren folgende:

1. Es gibt Mikroorganismen, die sowohl Gelatine als a-nucleinsaures Natron verflüssigen, wie die schon erwähnten leuchtenden Elbvibrionen, ferner *Prodigiosus*, Finkler Prior, Milzbrand, *Staphylococcus citr.* u. a. m.;

2. solche, die nur das a-nucleinsaure Natron verflüssigen, z. B. *Bac. typhi homin.* *Bact. Coli*;

3. solche, die nur die Gelatine, nicht das a-nucleinsaure Natron verflüssigen, *B. subtilis*;¹⁾

¹⁾ *B. subtilis* beginnt jetzt auch das a-nucleins. Natron zu verflüssigen. Anm. b. d. Korrektur 18. VII. 03.

4. solche, die eines von beiden m. w. energisch, das andere sehr langsam verflüssigen, so daß sich ein trockner Trichter, wie ich es nennen möchte, bildet, d. h. es verdunstet ebensoviele Flüssigkeit, als gebildet wird;¹⁾

5. solche, die keines von beiden verflüssigen, z. B. *Fluorescens long.*, *Proteus mirabilis*, Soor etc.²⁾

6. Die mit besondern Eigentümlichkeiten (Farbstoffbildung, Leuchten etc.) begabten Mikroorganismen behalten diese bei und lassen keinen wesentlichen Unterschied erkennen;

7. wohl aber zeigen sich bei verschiedenen Arten in der Wachstumsart im Stich einige Verschiedenheiten, die noch weiter zu verfolgen sind.

Um es noch einmal zu betonen, gelten diese Angaben nur für Zimmertemperatur und Stichtkulturen. Bei Brutofentemperatur konnte ich bisher in Ermangelung eines toluolfreien größeren Thermostaten nur ein paar besonders wichtigererscheinende Arten verfolgen.

Besonders interessant war mir das Verhalten der Kulturen von *B. typhi hom.* und *Bact. Coli communis*. Beide peptonisieren die Gelatine in dieser Konzentration des Nährbodens nicht, wohl das α -nucleinsäure Natron; aber der *Bacillus typhi* hat diese Fähigkeit in viel ausgeprägterem Grade als die von mir untersuchte Rasse von *Bact. Coli*. Von diesem konnte ich nur einen Stamm erhalten, während ich von Typhus zwei Kulturen prüfte, die von zwei verschiedenen Sektionen stammten. Beide lösten das α -nucleinsäure Natron viel energischer auf als das *Bact. Coli*, bei dem ich bei Zimmertemperatur wochenlang im Zweifel war, ob es überhaupt löse. Lange Zeit bildete sich nur eine ganz langsam fortschreitende Vertiefung der Oberfläche des Stiches aus und erst mit dem starken Ansteigen der Außentemperatur zeigte sich deutliche, sehr langsam fortschreitende Verflüssigung, während die zugleich geimpften Typhuskulturen längst den ganzen Nährboden verflüssigt hatten. Bei Brutofentemperatur zeigt *B. Coli* 24 Stunden später den Beginn der

¹⁾ Lufttrichter nach Kruse, 1896, S. 90.

²⁾ Ich benenne die Bakterien etc. zunächst so, wie ich sie aus dem path.-anat. Institut bezogen habe.

Verflüssigung, die bei *B. typhi* schon 24 Stunden nach der Impfung deutlich zu erkennen ist; bei der noch kürzlich von Bonhoff (1903) demonstrierten Schwierigkeit der Diagnose dürfte dieses eventuelle neue diagnostische Hilfsmittel nur willkommen sein.

Wenn wir also in Übereinstimmung mit der Ansicht, daß die Auflösung der Gelatine durch die Mikroorganismen eine Enzymwirkung darstellt, uns vorstellen, daß auch die Fähigkeit der Mikroorganismen, das a-nucleinsaure Natron zu verflüssigen, auf Enzymwirkung beruht, so sehen wir, daß in gewissen Fällen ein besonderes Enzym auftritt, das nur das letztere, nicht auch die Gelatine zur Verflüssigung zu bringen vermag. Mit Versuchen, die wahrscheinliche Enzymwirkung von den lebenden Zellen isoliert zu erhalten, bin ich noch beschäftigt. Ebenso mit Untersuchungen darüber, worauf die Umwandlung des a-nucleinsauren Natrons beruht, wodurch es seine Erstarrungsfähigkeit einbüßt. Damit im Zusammenhange steht das Bestreben, zu finden, wie weit die Nucleinsäure durch die Bakterien gespalten wird, ob es bis zur Bildung von freier Phosphorsäure etc. kommt.¹⁾ Dazu gehören natürlich Nährböden, die nur a-nucleinsaures Natron enthalten. Auf diesen wachsen aber die Mikroorganismen etwas langsamer als auf Fleischwasserpepton-a-nucleinsaurem Natron.

Eine weitere Reihe im Gang befindlicher Untersuchungen erstreckt sich auf die Frage, wie sich die Virulenz der pathogenen Arten nach dem Wachstum auf a-nucleinsaurem Natron verhält und ob sich nicht dieser Nährboden für sonst schwer oder nicht zu züchtende Arten, z. B. *Gonococcus* und andere, ersprießlich erweist. Wenn es mir möglich ist, möchte ich noch Versuche mit anderen Krankheiten machen, die der bakteriellen Ätiologie dringend verdächtig sind. Zu diesen verschiedenen Zwecken wird man natürlich das nucleinsaure

¹⁾ cf. Iwanoff diese Zeitschr. XXXIX. Bd. S. 31—43, erschien nach der Niederschrift dieser Arbeit. I. weist nach, daß Schimmelpilze eine tiefgehende Zersetzung des a-nucleinsauren Natron bewirken, die auf einer Fermentwirkung beruht («Nuclease»). Diese scheint den toten Zelleibern und der abfiltrierten zersetzten Kulturflüssigkeit anzuhaften.

Natron mit anderen schon bewährten Zusätzen: Glycerin, Zucker etc. kombinieren.

Über die Beziehungen des Vermögens der Bakterien das a-nucleinsaure Natron zu verflüssigen zu der Pyocyanase Emmerich und Löw's (1899) wird später zu berichten sein.

Schlußsätze:

1. Das a-nucleinsaure Natron eignet sich sowohl in destilliertem Wasser, als in 0,5%iger Kochsalzlösung, als in Fleischwasserpeptonbouillon gelöst in 2,5—5%iger Lösung vortrefflich als fester Nährboden für Mikroorganismen, und zwar sowohl für Stich- als Strich- als Plattenkulturen. Dazu ist der Nährboden sehr leicht herzustellen in völliger Durchsichtigkeit.

2. Die Fähigkeit der Mikroorganismen, Gelatine oder a-nucleinsaures Natron zu verflüssigen, geht nicht immer parallel, sondern es ist in vielen Fällen wahrscheinlich ein besonderes auf Nucleinsäure abgestimmtes Enzym vorhanden.

3. Es scheint in dem Verhalten gegen a-nucleinsaures Natron ein neues differential-diagnostisches Hilfsmittel zur Unterscheidung von *Bacterium Coli* und *Bacillus typhi hominis* gegeben zu sein, doch bedarf dieses Ergebnis noch ausgiebiger Nachuntersuchung.

4. Das a-nucleinsaure Natron erweist sich für die biologische Einteilung der Bakterien und zur Erforschung ihrer Wachstumsformen von einigem Interesse.

5. Ebenso wird es zu einer näheren Charakterisierung der proteolytischen Fermente eine willkommene Handhabe bieten.

Literatur:

- Araki, 1893, Über die enzymatische Zersetzung der Nucleinsäure. Diese Zeitschr., Bd. XXXVIII, S. 83—89, gibt noch die wichtigsten früheren Arbeiten über Nucleinsäure und das Verhalten der Nucleine zu Enzymen.
- A. Neumann, 1899, Verfahren zur Darstellung der Nucleinsäuren a und b und der Nucleothyminsäure. Archiv f. (Anat. u.) Physiologie 1899, Suppl. S. 552—555. Verhandlung der Physiol. Gesellsch., Berlin 9. Juni 1899.
- H. Kossel, 1894, Über die Einwirkung der Nucleinsäure auf Bakterien (nach gemeinschaftlich mit Herrn A. Kossel angestellten Versuchen). Verh. d. Physiol. Ges., Berlin 1894, S. 28—31. Archiv f. (Anat. u.) Physiol.
- W. Kruse, 1896, Einleitende Bemerkungen zur Klassifikation (der Bakterien) in C. Flügge, Die Mikroorganismen, II. Teil, III. Aufl., 1896.
- Bonhoff, 1903, Wasseruntersuchung und Typhusbacillen. Centralbl. f. Bakteriol. u. Parasitenk., 33. Bd., Originale Heft 6, p. 461.
- R. Emmerich und O. Löw, 1899, Bakteriolytische Enzyme als Ursache der erworbenen Immunität und die Heilung von Infektionskrankheiten durch dieselben. Zeitschr. f. Hyg., 31. Bd. S. 1—65.
- Dieselben, 1901, Zeitschr. f. Hyg., 36. Bd. S. 9—28.
- R. Emmerich, O. Löw und A. Kornhund, 1902, Centralbl. f. Bakter., XXXI, S. 1—25.
- Alb. Dietrich, 1901, Beruht die bakterienvernichtende Wirkung bakterieller Stoffwechselprodukte nach den von Emmerich und Löw angeführten Beweisen auf proteolytischen Euzymen (Nucleasen)? Habilitat.-Schrift, Tübingen 1901.
- A. Dietrich, 1902, Sind alle Einwände gegen die Natur und Wirkungsweise der sogenannten Nucleasen widerlegt? Centralbl. f. Bakteriol., XXXI Originale S. 165—170.
- R. Emmerich und Saida, 1900, Über die morpholog. Veränderungen der Milzbrandbazillen bei der Auflösung durch Pyocyanase. Centralbl. f. Bakteriol., XXVII Originale S. 776—787.
-

Zusammenstellung

der geprüften Mikroorganismen-Arten bezüglich ihres Verhaltens gegen 2,5%iges a-nucleinsaures Natron und gegen 10%ige Gelatine, beide in der gleichen Fleischwasser-Pepton-Bouillon gelöst: 1—27. A und B Vorversuche mit a-nucleinsaurem Natron in Wasser zu 5% gelöst und in Fleischwasser-Pepton-Bouillon zu 2,5%. (Nach dem Befunde am 27. VI. 03, dem Datum der Niederschrift.)

Lfde. Nr.	Datum der Impfung	Name des Organismus	Herkunft der Originalkultur	Verhalten gegen	
				a-nucleinsaures Natron	Gelatine
A	30. IV.	LeuchtenderElbvibrio 93	bezogen 1902 Hamburg	5% ₀ in dest. Wasser. Strichkultur. Verfl. nach 14 Tagen	—
B	1. V.	LeuchtenderElbvibrio 95	bezogen 1903 Hamburg	2,5% ₀ in Pepton-Bouillon. Verfl. deutl. nach 8 Tagen	—
1	25. V.	LeuchtenderElbvibrio 95	»	Verfl. von 30. V. an	Verfl. von 30. V. an
2	»	Milzbrand	pathol. anat. Inst. Heidelberg	Verfl. beginnt 6. VI.	Verfl. beginnt 30. V.
3	»	Bact. Coli comm.	»	Verfl. zweifelhaft bis 15. VI., dann deutl.	Keine Verfl.
4	»	Bac. Typhi homin. I	»	Verfl. beginnt 31. V.	Keine Verfl.
5	»	B. Prodigiosus I	»	Verfl. von 26. V. ab langsam	Verfl. sehr rasch
6	»	Staphylococcus citr.	»	Verfl. langsam	Verfl. langsam
7	»	Saccharomyces cerevis.	»	Verfl. deutl. aber sehr langsam von 1. VI. ab.	Keine deutl. Verfl. Kleiner Lufttrichter
8	»	Fluorescens longus	»	Keine Verfl.	Keine Verfl.
9	»	Proteus mirabilis	»	Keine Verfl.	Keine Verfl.
10	10. VI.	Bac. Typhi hom. II	»	Verfl.	Keine Verfl.
11	14. VI.	Schweinerotlauf	»	Verfl. nach 8 Tagen	Keine deutl. Verfl. Lufttrichter
12	»	V. Finkler Prior	»	Verfl. nach 48 Std.	Verfl. nach 24 Std.
13	»	Pseudomelanosus (P. Ernst)	»	Verfl. nach 8 Tagen	Keine Verfl.
14	»	Streptococcus	»	Verfl. sehr langsam	Keine Verfl.
15	»	Actinomyces	»	Keine Verfl.	Keine Verfl.
16	»	Taubendiphtherie	»	Lufttrichter	Keine Verfl.
17	»	Oidium lactis	»	Verfl. langsam, zuerst nach 8 Tagen	Keine Verfl.
18	»	Wurzelbacillus	»	Verfl. am 3. Tage.	Verfl. am 3. Tage
19	»	Sarcoma ventriculi	»	Keine deutl. Verfl. Lufttrichter?	Keine Verfl.
20	»	Sarcina aurantiaca	»	Lufttrichter	Verfl. nach 24 Std.
21	»	Spirillum rubrum	»	Keine Verfl.	Keine Verfl.
22	»	Bac. Indicus ruber	»	Verfl. nach 24 Std.	Verfl. erst langsamer, dann schneller
23	»	Bac. prodigiosus II	»	Verfl. nach 24 Std. am 27. VI. $\frac{2}{3}$ Verfl.	Verfl. rascher, am 22. ganz verfl.
24	»	Soor	»	Keine Verfl.	Keine Verfl.
25	»	Proteus vulgaris	»	Verfl. nach 24 Std.	Verfl. etwas rascher
26	»	Bac. subtilis	»	Keine Verfl. deutl.	Verfl. nach 8 Tagen
27	»	Bac. lacticus	»	Lufttrichter	Keine Verfl.