

# Über die Spaltung der Hefenucleinsäure durch Bakterien.

## I. Mitteilung.

Von

**A. Schittenhelm** und **F. Schröter.**

---

(Aus der med. Klinik der Universität Breslau.)

(Der Redaktion zugegangen am 4. Juli 1903.)

---

Die Versuche über die Einwirkung der Fäulnis<sup>1)</sup> auf die Purinbasen der Faeces zeigten, daß nach einigen Wochen der größte Teil derselben verschwunden war. Bei dem reichlichen Gehalt der Faeces an Bakterien lag es nahe, die Zersetzung als eine von den Mikroorganismen geleistete Arbeit zu betrachten. Von diesem Gedanken geleitet, wurden die nachfolgenden Untersuchungen angestellt. Da wir von der Ansicht ausgingen, daß die Hauptmenge der Purinbasen in den Faeces nicht präformiert, sondern in Form von Nucleinsubstanzen vorhanden sind, stellten wir in erster Linie Versuche über die Einwirkung von Bakterien auf Nucleinsäure<sup>2)</sup> an. Bei der Auswahl der zu benützenden Mikroorganismen schien uns das *Bacterium coli* das geeignetste, weil es einerseits eine dominierende Stellung in den Faeces einnimmt, und weil andererseits seine chemische Wirksamkeit (CO<sub>2</sub>-Bildung aus Traubenzucker, Säurebildung etc.) bekannt ist. Wir arbeiteten mit stets frisch gezüchteten Reinkulturen aus Stuhl.

Es handelte sich nun darum, einen Nährboden ausfindig zu machen, der ein üppiges Wachstum der Bakterien begünstigte, dabei aber selbst frei von Nucleinkörpern war und eine leichte Isolierung der Abbauprodukte gestattete. Diesen

---

<sup>1)</sup> Vergl. vorst. Arbeit.

<sup>2)</sup> Das Präparat wurde uns von der Firma Friedr. Bayer & Co. in bereitwilliger Weise zur Verfügung gestellt.

Anforderungen entsprach am besten der von Uschinsky<sup>1)</sup> angegebene eiweißfreie Nährboden, der folgende Zusammensetzung hat:

Wasser	1000	g
Glycerin	35	»
Chlornatrium	6	»
Magnes. sulf.	0,3	»
Chlorcalcium	0,1	»
Dikaliumphosphat	2,3	»
Ammon. lactic.	6,5	»
Natr. asparaginic.	3,5	»

Ein Vorversuch, bei dem wir 300 ccm Uschinskysche Lösung mit 0,5 g Hefenucleinsäure versetzten und nach Impfung mit Colibazillen 5 Tage lang im Brutschrank bei 37° stehen ließen, ergab mit der Salkowskischen Silberfällung einen Basenniederschlag, dessen N-Gehalt einer Basenmenge von 0,0112 g Basen entsprach. Da die Bakterienleiber nachgewiesenermaßen Nucleinsubstanzen enthalten,<sup>2)</sup> so haben wir in diesem, wie in allen folgenden Versuchen, zuerst die Mikroorganismen mit Hilfe von Bakterienfiltern aus der Lösung entfernt.

Der Abbau der Nucleinsäure zu Purinbasen konnte dann erst als durch Bakterien hervorgerufen angesehen werden, nachdem ein Einfluß der höheren Temperatur (Sterilisieren, Brutschrank, Eindampfen), sowie der Bestandteile der Kulturflüssigkeit ausgeschlossen war.

Daß derartige Einflüsse auf die Zersetzung der Nucleinsäure nicht statthaben, beweisen folgende Versuche:

- I. 300 ccm Uschinskysche Lösung wurden nach Zusatz von 2,0 g Hefenucleinsäure  $\frac{1}{2}$  Stunde lang im überhitzten Dampfstrom bei 120° sterilisiert. Die eine Hälfte wurde sofort, die andere Hälfte erst nach Eindampfen auf dem Wasserbade auf Basen verarbeitet.

<sup>1)</sup> Zentralbl. f. Bakteriolog., Bd. IV., S. 10.

<sup>2)</sup> Nishimura, Archiv f. Hyg., Bd. 18, S. 318.

Bendix, Deutsche med. Wochenschr., 1901, S. 18.

Kolle und Wassermann, Handb. der path. Mikroorg., S. 66.

Die Salkowskische Silberfällung lieferte in beiden Fällen ein negatives Resultat.

In den nachfolgenden 5 Versuchen wurde der Stickstoff, der in der Uschinskyschen Lösung in Form von milchsaurem Ammon und asparaginsaurem Natron enthalten ist, durch eine entsprechende Menge Nucleinsäure ersetzt. Zum Nachweis der Indifferenz der einzelnen Bestandteile des Nährbodens auf die Nucleinsäure wurde je ein Salz ausgeschaltet, und schließlich ein Versuch nur mit physiologischer Kochsalzlösung und Nucleinsäure angesetzt.

- Ia) 1000 ccm Uschinskysche Lösung (N durch 3,2 g Nucleinsäure ersetzt) + Bact. coli;
- b) dasselbe, aber ohne Dikaliumphosphat;
- c) wie a, aber ohne Chlorcalcium;
- d) wie a, aber ohne Magnes. sulf.;
- e) 1000 ccm physiologische Kochsalzlösung + 3,2 g Nucleinsäure + Bact. coli.

Nachdem diese Lösungen 10—14 Tage lang im Brutschrank gestanden hatten, zeigte sich bei der Verarbeitung auf Purinbasen überall ein positives Resultat. Nur in bezug auf das Wachstum der Bakterien war ein Unterschied insofern zu beobachten, als es in Iia am üppigsten und in Iie am geringsten war. Dementsprechend verhielten sich auch die Basenmengen, sodaß Iia alle übrigen übertraf.

Zur Feststellung der einzelnen abgespaltenen Basen wurden die salzsauren Salze von Iia bis Iie gemeinsam verarbeitet.<sup>1)</sup> Die Verdampfungsrückstände wurden mit heißem Wasser aufgenommen und mit wenig Knochenkohle entfärbt. Die klare Lösung wurde auf 100 ccm eingeengt und stark ammoniakalisch gemacht ( $\alpha$ ). Nach 24stündigem Stehen hatte sich ein dicker, flockiger Niederschlag abgesetzt, der nichts anderes als Magnesiumhydroxyd war. Nach Auskochen dieses abfiltrierten Niederschlages mit Natronlauge schied das mit Essigsäure im Über-

---

<sup>1)</sup> Zur Trennung der Basen wurde im allgemeinen die in Hoppe-Seyler — Thierfelder, chem. Analyse, 1903, S. 573 — angeführte Methode unter gewisser Abänderung benutzt.

schoß versetzte Filtrat auch nach 24stündigem Stehen ganz geringe Spuren eines Niederschlages (Guanin?) ab.

Das Filtrat ( $\alpha$ ) von der  $\text{NH}_3$ -Fällung wurde zur Trockene eingedampft, mit 100—150 ccm heißem Wasser aufgenommen, schwach salzsauer gemacht und mit einer konzentrierten Lösung von Natriumpikrat so lange versetzt, bis kein Niederschlag mehr entstand. Das sofort abgesaugte Adeninpikrat, das unter dem Mikroskop die charakteristisch büschelförmig angeordneten Nadeln (Zwillingskrystalle) zeigte, wurde bei  $100^\circ$  getrocknet. Sein Zersetzungspunkt lag bei  $283^\circ$ .

Mit dem Filtrat wurde eine Kupferfällung vorgenommen, da eine Entfernung der Pikrinsäure durch Anschütteln der salpetersauer gemachten Lösung mit Benzol nicht zur Zufriedenheit gelang. Es wurde also das Filtrat mit Natriumbisulfat stark angesäuert und mit Kupfersulfatlösung (1 : 10) im Überschuß gefällt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, gut ausgewaschen, nochmals mit Wasser ausgekocht und wieder abfiltriert. Danach wurde er in wenig Wasser suspendiert und durch Einleiten von Schwefelwasserstoff zersetzt. Nachdem das Schwefelkupfer abfiltriert worden war, wurde das Filtrat mit Salzsäure zur Trockne eingedampft und mehrmals mit Alkohol abgedunstet. Der Rückstand wurde in möglichst wenig heißem Wasser aufgelöst und schied nach 24stündigem Stehen in Eiswasser einen grobkörnigen, weißen Niederschlag von Xanthin und salzsaurem Xanthin ab. Da die Menge zu einer Analyse nicht ausreichte, so wurden die üblichen Xanthinproben<sup>1)</sup> angestellt, die sämtlich positiv ausfielen.

Das Filtrat vom Xanthin wurde mit wenig Pikrinsäure (in Substanz) in kleinem Überschuß versetzt und auf dem Wasserbade so lange eingeeengt, bis eine Krystallisation begann. Nach dem Erkaltenlassen hatte sich ein Körper ausgeschieden, der unter dem Mikroskop zweierlei Krystallformen zeigte: erstens die für Hypoxanthinpikrat charakteristischen tafelförmigen Gebilde, zweitens kompakte über das ganze Gesichtsfeld sich ausdehnende (anscheinend hexagonale) Säulen. Daß in diesem Niederschlag

---

<sup>1)</sup> Thierfelder, l. c., S. 143.

Hypoxanthin tatsächlich vorhanden war, zeigte — nach Überführung in Hypoxanthinsilberpikrat — dessen charakteristische Krystallform.

Durch diese Versuche ist also zweifellos dargetan, daß durch die Einwirkung von Mikroorganismen eine Abspaltung von Purinbasen aus Hefenucleinsäure stattfindet.

Ob nun die Bakterien selbst oder ihre Enzyme<sup>1)</sup> diese Spaltung bewirken, werden weitere Versuche ergeben. Jedenfalls geht aus den Versuchen hervor, daß die Hefenucleinsäure durch das *Bacterium coli* in der Weise abgebaut wird, daß neben andern Spaltungsprodukten (deren Identifizierung wir uns vorbehalten) freie Basen entstehen. Die Menge der isolierten Basen war eine äußerst geringe, sodaß wir von den einzelnen Reinprodukten nur Centigramme bekamen. Da wir zunächst darauf verzichteten, den Rest der unzersetzten Nucleinsäure quantitativ wiederzugewinnen, haben wir auch noch kein abschließendes Urteil über den quantitativen Verlauf der Reaktion. Wir haben diesbezügliche Versuche noch in Arbeit.

Es sei übrigens hier schon bemerkt, daß die geringe Ausbeute an Basen nicht wundernehmen darf, da man annehmen muß, daß auch diese — wie die Nucleinsäure selbst — weiter abgebaut werden. Den Beweis für die Richtigkeit dieser Annahme haben wir bereits in der Hand, insofern ein Versuch mit Adenin (der später nebst andern genauer publiziert werden soll) ergab, daß durch eine Reinkultur von *Bact. coli* daraus Hypoxanthin gebildet wurde. In diesem Sinne dürfte auch das Fehlen von Guanin, das doch durch Kochen von Hefenucleinsäure mit verdünnter Schwefelsäure leicht gewonnen werden kann, zu erklären sein. Über diesen Punkt sowie über das weitere Schicksal von Xanthin und Hypoxanthin unter dem Einfluß von *Bact. coli* sollen weitere Versuche, die wir in Arbeit haben, Aufschluß geben. Des weitern wollen wir dann die Wirksamkeit anderer Bakterienarten in dieser Richtung feststellen.

<sup>1)</sup> Vgl. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 36, S. 9, Emmerich und Löw.