

Über die Spaltung der Hefenucleinsäure durch Bakterien.

(III. Mitteilung.)

Von

A. Schittenhelm und **F. Schröter.**

Mit einer Abbildung.

(Aus der med. Klinik der Universität Breslau.)

(Der Redaktion zugegangen am 29. September 1903.)

Die in der Mitteilung II angeführte Beobachtung, daß bei den Versuchen¹⁾ mit Coli und Faeces schon am zweiten Tage eine deutliche Gasentwicklung eintrat, veranlaßte uns, diesem Vorgange genauer nachzuforschen.

Die umfangreichen gasanalytischen Untersuchungen von Lübbert²⁾ und Hesse³⁾ haben die schon früher angenommene direkte Gasatmung der Bakterien experimentell bewiesen, indem sie in der atmosphärischen Luft des Kulturgefäßes ein allmähliches Schwinden des Sauerstoffs und entsprechendes Auftreten von Kohlensäure konstatierten. Der Einwand Scheuerlens,⁴⁾ daß die abgeschiedene CO₂-Menge aus der dem Nährboden beigefügten Soda stammen könnte, wurde von Hesse⁵⁾ später widerlegt und auch Scheuerlen⁶⁾ zog in der Folge auf Grund erneuter Versuche seinen Einwand zurück.

Außer der Produktion der CO₂ durch bakterielle Atmung werden durch den Einfluß von Mikroorganismen infolge Zersetzung des Nährbodens auch noch andere Gase wie H₂S, H₂, CH₄, N₂ gebildet. Derartige Prozesse spielen sich vor allem bei der Fäulnis ab, wobei u. a. die N-haltigen Bestandteile bis zum Ammoniak zerlegt und durch bakterielle Tätigkeit das

1) S. Mitteilung II, D. Z. vorstehende Arbeit.

2) Biol. Spaltpilzunters. 1886, S. 38 ff.

3) Z. f. Hyg. und Inf.-Krankh., Bd. XV, 1893, S. 17.

4) Arch. f. Hyg., Bd. 26, S. 29.

5) Ebenda, Bd. 28, S. 7.

6) Internat. Beitr. z. inn. Med. (Leyden-Festschrift) 1902, Bd. II, S. 205.

NH_3 zu Nitraten oxydiert wird.¹⁾ «Nitrifikation». Unter Luftabschluß kann aus Nitraten und Nitriten durch Reduktion elementarer N_2 abgespalten werden.²⁾ «Denitrifikation». Auch pathogene Bakterien, z. B. Typhus und Koli, entwickeln aus nitrathaltigen Peptonlösungen freien Stickstoff.³⁾

Die Beobachtung, daß bei unseren Versuchen sich eine Gasentwicklung durch Blasenbildung sichtbar machte, legte sofort die Vermutung nahe, daß es sich nicht um einfache bakterielle Atmung, sondern um gasförmige Zersetzung der Nährsubstanz handeln möchte. Um das entstandene Gas auffangen zu können, trafen wir folgende Versuchsanordnung:

In einer ca. 7 l fassenden Standflasche A wurde das Reaktionsgemisch untergebracht. Durch einen doppelt durchbohrten gut schließenden Gummistopfen waren zwei Hahnröhren gesteckt,

von denen die eine bis auf den Boden des Gefäßes reichte, während die andere mit

dem unteren

Rande des

Stopfens ab-

schnitt. Dieselbe

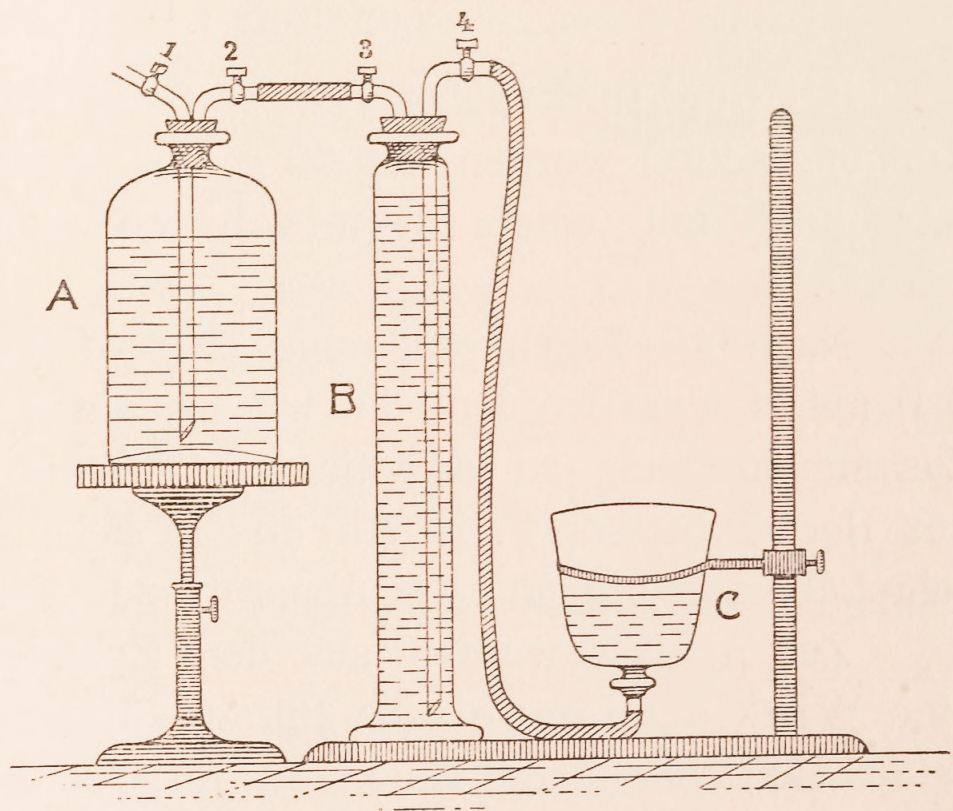
Einrichtung besaß

der Zylinder B,

der seinerseits

durch einen

Gummischlauch mit der beliebig hoch und niedrig zu stellenden umgekehrten Glocke C verbunden war. Die Verbindung der Gefäße A und B ist aus der Figur ersichtlich.



¹⁾ Flügge, Mikroorg. 1896. I. Teil, S. 251 ff.

²⁾ l. c. S. 261.

³⁾ Grimbert, Ann. de l'inst. Pasteur 1899. Tome XIII, p. 67, Hugounency und Dogon, Comptes rendus de la Soc. de Biol. 1897. S. 198; 1898, S. 635 und 835.

Nachdem der Inhalt der Flasche A geimpft, wurden die Hähne 1 und 2 geschlossen, die Verbindung zwischen 2 und 3 gelöst und durch Hochstellung der mit Wasser gefüllten Glocke C bei offenen Hähnen 3 und 4 der Zylinder B vollständig mit Wasser gefüllt. Sowie bei Hahn 3 das Ausfließen begann, wurde dieser geschlossen, die Gummischlauchverbindung zwischen 2 und 3 wieder hergestellt und die Glocke C in ihre tiefste Lage gebracht. Nun werden die Hähne 2 und 3 geöffnet. Der ganze Apparat befand sich in einem kleinen Zimmer, das durch Gasheizung unter Einschaltung eines Thermoregulators auf 38° C. gehalten wurde. Ehe die Analyse selbst ausgeführt wurde, ließen wir das aufgefangene Gas, sowie die Absorptionspipetten, zwecks Einstellung auf gleiche Temperatur, mehrere Stunden im Arbeitszimmer stehen.

Versuch I.¹⁾

6 l Uschinskyscher Lösung (ohne Natr. asparagin. und Ammon. lactic.) wurden mit 60 g nucleinsaurem Natrium versetzt und mit einem Gemisch von Fäulnisbakterien geimpft.

Nach 10 Tagen war eine größere Gasmenge (reichlich 3 l) aufgefangen worden, die wir benützten, um uns über die Zusammensetzung zu orientieren. Für die Gasanalyse stellte uns Herr Professor F. B. Ahrens in liebenswürdigster Weise sein Laboratorium und die Apparate zur Verfügung.

Zur Analyse wurden aus dem Zylinder ca. 100 ccm in eine Winkler-Hempelsche Bürette übergefüllt und die einzelnen Bestandteile mit Hilfe Hempelscher Absorptionspipetten festgestellt.

Das Gasgemenge (100 ccm) wurde zunächst zur Absorption der Kohlensäure in die Ätzkalipipette gesaugt, nach 2 Minuten wieder in die Bürette zurückgenommen und gemessen. Der Gasrest betrug 79,4 ccm, mithin: CO_2 positiv.

¹⁾ Der Gang der Analyse entspricht ungefähr der in Hempel, gasanalyt. Meth., III. Aufl., Braunschweig 1900, S. 246 ff. angegebenen Untersuchung von Leuchtgas.

Der Gasrückstand wurde zur Absorption der schweren Kohlenwasserstoffe in die Pipette mit rauchender Schwefelsäure hinüber gedrückt, kurze Zeit geschüttelt und in die Bürette zur Messung zurückgebracht. Keine Volumenänderung,

mithin: Schwere Kohlenwasserstoffe negativ.

Danach wurde der Gasrückstand in eine Pipette mit alkalischer Lösung von pyrogallussaurem Natron (5 g Pyrogallussäure, gelöst in 15 g Wasser, mit 120 g Ätzkali, gelöst in 80 ccm Wasser, in der Pipette vereinigt) übergeführt und nach 3 Minuten langem Schütteln zurückgenommen und gemessen. Gasrest 71,0 ccm,

mithin: Sauerstoff positiv.

Der Gasrückstand kam hierauf in eine Pipette mit gebrauchter ammoniakalischer Kupferchlorürlösung und wurde nach 5 Minuten langem Schütteln in die Bürette zurückgeführt. Keine Volumenänderung

mithin: Kohlenoxyd negativ.

Der Gasrest wurde bis auf einen Rückstand von 10,8 ccm herausgedrückt. Hierauf wurden 38,8 ccm reiner Sauerstoff hinzugesaugt, sodaß das Gesamtvolumen 49,6 ccm betrug. Das Gemisch wurde nun in die mit Quecksilber gefüllte Hempelsche Explosionspipette gebracht, durch Explosion verbrannt, dann in die Bürette zurückgeführt und gemessen. Es ergaben sich 36,4 ccm; es war also eine Gesamtkontraktion von 13,2 ccm vorhanden,

mithin: Wasserstoff positiv.

Der nach der Verbrennung zurückgebliebene Gasrest wurde in die Ätzkalipipette geführt, kurz geschüttelt und in die Bürette zurückgenommen. Es blieben 35,7 ccm,

mithin: Methan positiv.

Der Rückstand von 35,7 ccm war Stickstoff.

Das Resultat des Versuchs stellt sich folgendermaßen dar:

Angewandte Gasmenge 100 ccm.	
Nach KOH-Absorption 79,4 ccm	= 20,6% CO ₂
» Abs. mit rauch. H ₂ SO ₄ 79,4 ccm	= 0,0% schw. Kohlenwasserstoffe
» » » pyrogalluss. Na 71,0 ccm	= 8,4% O
» » » Cu ₂ Cl ₂ 71,0 ccm	= 0,0% CO.
13,2 ccm Kontrakt. pro 10,8 ccm Gas + 38,8 ccm O	= 7,9% H ¹⁾
Durch KOH absorbiert 0,7 ccm	= 4,6% CH ₄
Aus der Differenz	58,5% N
	100,0

¹⁾ Die Berechnung des H und des CH₄ erfolgte nach Hempel; l. c. S. 247.

Versuch II.

500 ccm Uschinskysche Lösung (ohne Glyzerin, Natr. asparag. und Ammonn. lact.) wurden mit 5 g nucleinsaurem Natron versetzt, mit einer Kolireinkultur geimpft und des weiteren wie Versuch I angesetzt.

Nach 7 Tagen wurde die Reaktion unterbrochen. Um die ganze Gasmenge messen zu können, wurde durch Hahn 1 so lange Wasser in die Flasche A hineingedrückt, bis alles Gas sich im Zylinder B befand, bzw. bis das Wasser nachfloß. Es ergaben sich 575 ccm, wovon 320 ccm auf die anfangs in der Flasche über der Nährflüssigkeit befindliche Luft zu rechnen sind. Es wurden zwei Analysen angesetzt, deren Resultate folgende waren:

a.

Angewandt 97,7 ccm Gas.

Durch KOH absorbiert 4,8 ccm	=	4,9% CO ₂
> rauch. H ₂ SO ₄ 0,0 ccm	=	0,0% schw. Kohlenwasserstoffe ¹⁾
> pyrogalluss. Na 5,3 ccm	=	5,4% O
> Cu ₂ Cl ₂ 0,0 ccm	=	0,0% CO ¹⁾
Keine Explosion	{	= 0,0% H
		= 0,0% CH ₄
Aus der Differenz		89,7% N
		100,0

b.²⁾

Angewandt 90,2 ccm Gas.

Durch KOH absorbiert 3,9 ccm	=	4,3% CO ₂
> pyrogalluss. Na 4,5 ccm	=	5,0% O
Keine Explosion	{	= 0,0% H
		= 0,0% CH ₄
Aus der Differenz		90,7% N

100,0

¹⁾ Auf schw. Kohlenwasserstoffe und CO wurde bei den folgenden Analysen nicht mehr geprüft.

²⁾ Die Differenzen zwischen den Resultaten von a und b sind infolge einer stattgehabten Temperaturänderung etwas groß.

Versuch III.

1000 ccm Uschinskysche Lösung (ohne Natr. asparagin. und Ammon. lact. mit 40 g Glyzerin) + 10 g nucleinsaurem Natrium wurden mit einer Kolireinkultur geimpft und des weiteren wie Versuch I angesetzt. Am zweiten Tage begann eine auffallend deutliche Gasentwicklung.

Nach 4 Tagen wurde das gebildete Gas vollständig in den Zylinder übergedrückt und gemessen. Es ergaben sich 1150 ccm Gasmenge. Da nun das über dem Reaktionsgemisch in der Flasche A befindliche Luftvolumen 800 ccm betrug, so waren durch bakterielle Tätigkeit 350 ccm Gas entwickelt worden.

Die Analysen des Gesamtgasgemisches ergaben folgende Resultate:

a.

Angewandt 97,7 ccm Gas.

Durch KOH absorbiert 24,5 ccm	= 25,1 % CO ₂
» pyrogalluss. Na 1,2 ccm	= 1,2 % O
Keine Explosion	{ = 0,0 % H
	{ = 0,0 % CH ₄
Aus der Differenz	73,7 % N
	<hr/>
	100,0

b.

Angewandt 99,0 ccm Gas.

Durch KOH absorbiert 24,8 ccm	= 25,1 % CO ₂
» pyrogalluss. Na 1,0 ccm	= 1,0 % O
Keine Explosion	{ = 0,0 % H
	{ = 0,0 % CH ₄
Aus der Differenz	73,9 % N
	<hr/>
	100,0

Um uns zu überzeugen, daß die beobachtete Gasentwicklung nicht auf bloße bakterielle Atmung zurückzuführen sei, sondern daß tatsächlich eine Gasbildung aus dem Nährmaterial stattfindet, setzten wir den Versuch I mit einer größeren Menge an und impften mit einem Gemisch von Fäulnisbakterien, in der

Erwartung, daß dadurch die Reaktion möglichst intensiv verläuft. Unsere Voraussetzung bestätigte sich vollauf, wir erhielten reichlich 3 l Gasgemisch, die zu dem anfänglich vorhandenen Luftvolumen hinzugekommen waren.

Die bei der Analyse gefundenen 20,6% Kohlensäure sind zum Teil als Produkt der Atmung anzusehen, die große Menge jedoch macht es wahrscheinlich, daß sie andernteils durch Gärwirkung der Bakterien entstanden ist.

Die ermittelten 8,4% Sauerstoff entstammen zweifelsohne dem Rest der anfänglich vorhandenen atmosphärischen Luft, ebenso ein Teil des Stickstoffs. Der Überschuß an Stickstoff, der durch eine oberflächliche Berechnung mit Sicherheit festgestellt war, war bei der Zersetzung des Nährbodens entstanden.

Wasserstoff und Methan, die nur bei diesem Versuch festgestellt werden konnten, sind durch tief eingreifende Fäulnis hervorgerufen.

Daß der Stickstoffüberschuß aus der Nucleinsäure abgespalten worden war, stand fest, da unser Nährsubstrat keinen andern N-haltigen Körper enthielt. Anders war es mit der Kohlensäure. Sie konnte dem Glyzerin oder der Nucleinsäure oder auch beiden entnommen sein. Ein Versuch, der mit Uschinskyscher Lösung (ohne Natr. asparagin. und Ammon. lact.) mit der doppelten Menge Glyzerin (70 g pro 1000 ccm) angesetzt und mit Koliereinkultur geimpft worden war, ergab keine Gasentwicklung, da die Bakterien in diesem Nährboden nicht wuchsen. Wir mußten daher quantitative Versuche veranstalten, den einen mit Nucleinsäure allein, den andern mit Nucleinsäure und Glyzerin, sodaß wir nachher durch Vergleich der Resultate das gewünschte Urteil erhielten. Da wir bei dem ersten Versuche ein der Zusammensetzung nach unbekanntes Fäulnisbakteriengemisch angewandt hatten, so schien es einerseits von bakteriologischem Interesse, mit einer Reinkultur zu arbeiten, andererseits erhofften wir dadurch ein einfacher zusammengesetztes Gasgemisch zu erhalten. Deshalb verwandten wir bei Versuch II und III eine Reinkultur von *Bakt. coli com.*

Der besseren Übersicht halber haben wir aus den Doppelversuchen von II und III die mittleren Werte berechnet und in nachstehendem einander gegenübergestellt.

	II (Natr. nuclein.)	III (Natr. nuclein + Glyzerin)
CO ₂	4,6 %	25,1 %
O	5,2 %	1,1 %
N	90,2 %	73,8 %

Um den Überschuß an Stickstoff zu ermitteln, mußte der zur atmosphärischen Luft gehörende Stickstoff berechnet und in Abzug gebracht werden.

Berechnung von Versuch II. Die bei der Analyse erhaltenen 90,2% N entsprechen auf die gesamte Gasmenge von 575 ccm berechnet 518,7 ccm N. Da am Anfang des Versuchs 320 ccm atmosphärische Luft vorhanden waren, die nach der Gleichung

$$\frac{\text{Luft}}{\text{N}} = \frac{100}{79} = \frac{320}{X}$$

$$X = 252,8 \text{ ccm N entsprachen,}$$

so waren aus dem Nährboden

$$518,7 - 252,8 = 265,9 \text{ ccm N}$$

durch Abbau der Nucleinsäure entwickelt worden.

Berechnung von Versuch III. Die Berechnung, die analog der vorhergehenden ausgeführt wurde, ergab, daß aus dem Nährboden

$$848,7 - 632,0 = 216,7 \text{ ccm N}$$

durch Abbau der Nucleinsäure entwickelt worden waren.

Durch beide Versuche ist also festgestellt, daß bei der Spaltung der Hefenucleinsäure durch Bakterien, speziell Coli, freier N abgespalten wird.

Wie vorn erwähnt wurde, ist es eine bekannte Tatsache,¹⁾ daß Mikroorganismen aus Nitraten und Nitriten elementaren N_2 abspalten können, was u. a. auch für Coli²⁾ nachgewiesen ist. Unser Nährboden enthielt aber von vornherein weder Nitrate noch Nitrite; auch im Verlauf der Reaktion sind solche nicht gebildet worden, wie der negative Ausfall der Diphenylaminreaktion ergab. Es muß daher angenommen werden, daß nicht nur Nitrate und Nitrite, sondern auch andere Körper (Amido- und Imidogruppen) befähigt sind, unter bakteriellem Einfluß ihren Stickstoff als solchen abzugeben.

Das Fehlen von Nitriten und andererseits das Vorhandensein von aus Nucleinsäure gebildetem Ammoniak, worauf wir später noch zurückkommen werden, beweist fernerhin, daß der frei gewordene Stickstoff nicht einer wechselseitigen Einwirkung von amid- und nitrihaltigen Stoffwechselprodukten seinen Ursprung verdankt, wie von Grimbert²⁾ in Erwägung gezogen wurde, sondern daß er tatsächlich als echtes Sekret der Bakterienzelle aufgefaßt werden muß.

Was die aus Nucleinsäure abgespaltenen Mengen freien Stickstoffs anbelangt, so zeigt sich, daß bei Versuch III, der mit 10 g nucleinsaurem Natrium angesetzt worden war, etwas weniger freier Stickstoff gebildet wurde, wie in Versuch II, der nur 5 g enthielt, obgleich jedoch die Wachstumsbedingungen für Bakterien in Versuch III durch die Anwesenheit von Glycerin günstigere waren als bei Versuch II. Der Grund für die Differenz dürfte wesentlich in der verschiedenen Reaktionsdauer zu suchen sein.

Die Kohlensäure verdankt sicherlich zum Teil ihre Anwesenheit der bakteriellen Atmung, während ein anderer Teil (wenigstens bei II und III) durch Vergärung des Nährmaterials entstanden ist. Um ein ungefähres Bild über diese Verhältnisse zu gewinnen, müssen wir erst das Verhältnis von gebildeter Kohlensäure zu verbrauchtem Sauerstoff kennen. Welcher Anteil

¹⁾ Flügge, Mikroorganismen, III. Aufl., S. 261.

²⁾ Grimbert, Annal. de l'Inst. Pasteur 1899, Tome XIII, p. 67.

der gebildeten Kohlensäure aber auf Atmung, welcher auf Gärung zurückzuführen ist, würde sich zahlengemäß erst dann entscheiden lassen, wenn der «respiratorische Quotient»¹⁾ für die betreffende Bakterienart bekannt ist.

Die bei Versuch II gefundenen 4,6% CO₂ entsprechen im Gesamtgasgemisch von 575 ccm 26,5 ccm CO₂.

Da anfänglich 320 ccm Luft mit 67,2 ccm O zur Verfügung standen und 5,2% bzw. 29,9 ccm O im Gesamtgasgemisch wiedergefunden wurden, so waren 67,2 — 29,9 = 37,3 ccm O für die Atmung verbraucht.

Es ergibt sich sonach:

$$\frac{\text{CO}_2}{\text{verbrauchtem O}} = \frac{26,5}{37,3} = \frac{0,7}{1}$$

Bei Versuch III betrug die gefundene Kohlensäure 25,1% = 288,6 ccm im Gesamtgasgemisch von 1150 ccm. Die ursprünglich vorhandene Luft betrug 800 ccm = 168,0 ccm O.

Wiedergefunden waren 1,1% = 12,7 ccm O,
verbraucht waren also 168,0 — 12,7 = 156,3 ccm O;

mithin ergibt sich:

$$\frac{\text{CO}_2}{\text{verbrauchtem O}} = \frac{288,6}{156,3} = \frac{1,9}{1}$$

Ein erheblicher Teil der gebildeten Kohlensäure entfällt auf die bakterielle Atmung. Wenn nun noch CO₂ durch Gärung des Nährbodens entstanden war, so konnte sie aus den Zuckergruppen der Nucleinsäure und aus dem Glyzerin stammen. Eine Prüfung auf Zuckergruppen,²⁾ die nach Kossel als Pentose und Hexose in der Hefenucleinsäure vorkommen, ergab in

¹⁾ Nähere Angaben und Untersuchungen bezüglich der Frage des «respiratorischen Quotienten» finden sich in unserer demnächst erscheinenden Mitteilung «über Gasbildung und Gasatmung von Bakterien» im Zentralblatt für Bakteriologie.

²⁾ Das aus unserem Präparate nach Aufschließen mit H₂SO₄ erhaltene Glukosazon hatte den Schmelzpunkt 209°; vom Pentosazon gelang es uns nicht, genügende Mengen zur Schmelzpunktbestimmung zu erhalten.

unserem Präparat nur äußerst geringe Mengen, sodaß eine Entstehung von Kohlensäure, wie wir sie in Versuch II fanden, nur zum geringsten Teil auf Vergärung zurückgeführt werden konnte. Sie mußte vielmehr der Hauptsache nach ein Produkt der bakteriellen Atmung sein.

Hieraus folgt ohne weiteres, daß bei Versuch III der größere Teil der CO_2 seine Bildung der Zersetzung des Glyzerins verdankt.
