



dieser großen Menge von Zersetzungsprodukten muß es befremden, daß Taylor<sup>1)</sup> mit dem *Bact. coli comm.* nur einen wenig eingreifenden Abbau konstatieren konnte, mit *Proteus* dagegen ausgiebige Zersetzung bekam. Der Grund hierfür ist wohl in einer fehlerhaften Versuchsanordnung zu suchen, indem *Proteus* unter den gegebenen Bedingungen gut wachsen konnte, während *Bact. coli* schon nach kurzer Zeit (wegen ungenügender Ernährungsbedingungen: Mangel an Kohlehydraten und Salzen) seine Wachstumsenergie und damit seine Reaktionsfähigkeit verlor.

Speziell für unsere Versuche von näherliegendem Interesse sind die Arbeiten von Baginski<sup>2)</sup> und Schindler<sup>3)</sup>, wonach bei der Fäulnis die Purinbasen allmählich zerstört wurden, nachdem Adenin in Hypoxanthin und Guanin in Xanthin umgewandelt worden waren. Versuche über den Einfluß von Mikroorganismen sind nur von Plenge<sup>4)</sup> und Iwanoff<sup>5)</sup> gemacht. Ersterer konnte feststellen, daß eine Reihe verschiedener Bakterien imstande war, die  $\alpha$ -Nucleinsäure des Thymus in eine  $\beta$ -Nucleinsäure umzuwandeln. Letzterer beobachtete unter Einwirkung von Schimmelpilzen eine Zersetzung der Thymonucleinsäure bei Abspaltung von Purinbasen, Ammoniak und Phosphorsäure.

Kostytschew<sup>6)</sup> hat jüngst unter Kossels Leitung, nachdem er sich durch eine Verbesserung der alten Neumannschen Methode in den Besitz von reinem  $\alpha$ - und  $\beta$ -thymonucleinsaurem Natron gesetzt hatte, nachgewiesen, daß bei der Umwandlung der  $\alpha$ -Nucleinsäure in die  $\beta$ -Nucleinsäure durch Kochen zwei Drittel der Nucleinbasen abgespalten werden. Wenn man von dieser Beobachtung ausgehend Plenges Resultate betrachtet, so ergibt sich als sehr naheliegend, daß die von letzterem gefundene Umwandlung der  $\alpha$ -Nucleinsäure in  $\beta$ -Nucleinsäure durch bakterielle Einflüsse eben auch nur auf einer Abspaltung von Nucleinbasen beruht und somit einen Be-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI, S. 487.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. VIII, S. 395.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. VII, S. 441.

<sup>4)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 190.

<sup>5)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 31.

<sup>6)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 545.

weis liefert für die Richtigkeit unserer in Mitteilung II auf Grund vorläufiger Versuche beschriebenen Resultate betreffend die Abspaltung von Nucleinbasen aus Nucleinsäure durch Bakterien, nur daß wir Hefenucleinsäure, Plenge Thymonucleinsäure als Nährboden verwendeten. Weitere Untersuchungen über diese interessante Betätigung von Bakterien dürften eine anziehende Aufgabe der bakteriellen Biologie darstellen.

Bei den nun folgenden Untersuchungen kam es uns darauf an, eine möglichst umfassende analytische Zusammenstellung der bakteriellen Zersetzungsprodukte von Hefenucleinsäure zu geben. Daß wir davon eine beträchtliche Anzahl zu erwarten hatten, war uns bei der komplizierten Zusammensetzung der Nucleinsäure von vornherein klar.

#### Experimenteller Teil.

Von anorganischer Substanz handelte es sich vor allem um abgespaltene Phosphorsäure. Zu ihrem Nachweis wurden 1000 cem Uschinskischer Lösung (ohne Dikaliumphosphat, Ammonium lacticum, Natrium asparaginicum) mit 10 g nucleinsaurem Natrium versetzt, mit einer Reinkultur von *Bact. coli* geimpft und 10 Tage lang bei Brutschranktemperatur stehen gelassen. Danach wurde durch ein Bakterienfilter filtriert. 200 cem des Filtrates wurden mit Alkohol von der Nucleinsäure befreit und nach Wegdampfen des Alkohols mit der Magnesiafällung sowohl, wie mit der Molybdänfällung das Vorhandensein von Phosphorsäure, allerdings in recht geringen Mengen, nachgewiesen. Das *Bact. coli* hatte also aus der Nucleinsäure Phosphorsäure abgespalten.

Die bei der Gasanalyse (III. Mitteilung) gefundene Kohlensäure stammte zum kleinen Teil, wie schon erwähnt, aus den Zuckergruppen<sup>1)</sup> der Nucleinsäure. Es stand zu erwarten, daß der bei der Vergärung gleichzeitig gebildete Alkohol durch die Bakterien schnell weiter verbrannt werden würde. Dennoch gelang es uns, aus eigens hierzu mit Colireinkultur, analog den früheren, an-

<sup>1)</sup> Daß in dem von uns benutzten Präparate von hefenucleinsaurem Natrium (Bayer u. Co.) neben Hexosen (s. Mitteilung III, S. 79, Anm.) auch Pentosen vorhanden waren, beweist der positive Ausfall der Orcinsalzsäureprobe.

gesetzten Versuchen durch die Jodoform-, die Essigäther- und die Kaliumbichromatprobe geringe Mengen von Alkohol mit Sicherheit nachzuweisen. Somit war festgestellt, daß die Zuckergruppen der Hefenucleinsäure durch *Bacterium coli* in Alkohol und Kohlensäure gespalten werden.

Für die Ermittlung organischer Säuren als Spaltungsprodukte der Hefenucleinsäure wurden zur Orientierung einige Versuchslösungen vereinigt, die zwar mit Reinkulturen angesetzt waren, aber sich schließlich als auch mit anderen Fäulnisbakterien verunreinigt erwiesen hatten. Durch Destillation mit Wasserdampf wurde im Destillat Ameisensäure durch Reduktion von Silbernitrat festgestellt.

Der Rückstand wurde mit Barytwasser gefällt, filtriert und die Baryumsalze mit Schwefelsäure zersetzt. Der sehr geringe Rückstand freier organischer Säuren wurde destilliert und ergab nur zwischen 120° und 140° eine größere Fraktion von außerordentlich unangenehm stechendem Geruch. Nach längerem Stehen bei Zimmertemperatur schieden sich aus der braunen, harzigen Flüssigkeit einige unregelmäßige Kristalle ab, die auf der Tonplatte mit Alkohol und Äther gewaschen wurden. Ihr Schmelzpunkt lag scharf bei 183°. Beim Erhitzen auf dem Spatel trat bald nach dem Schmelzen Zersetzung ein in brenzlich riechende, im Halse kratzende Produkte. Der Körper war stickstofffrei. Zu einer genaueren Analyse reichte das Material nicht aus, weshalb wir uns jeglicher Vermutung enthalten.

In der ursprünglichen Reaktionsflüssigkeit war es übrigens auch gelungen, Oxalsäure als Calciumoxalat mikroskopisch nachzuweisen.

Da die zuletzt aufgeführten Resultate durch Anwendung richtiger Uschinskischer Lösung (d. h. mit *Natr. asparagin.* und *Ammon. lact.*), sowie durch Einwirkung einer Mischkultur von unbekannter Zusammensetzung getrübt schienen, setzten wir einen neuen Versuch in folgender Weise an:

Nährlösung: Wasser	1000 ccm
Chlornatrium	6.0 g
Chlorcalcium	0.1 "
Magnesiumsulfat	0.3 "
Nucleinsaures Natrium	15.0

Für die Zusammensetzung dieses Nährbodens war uns die Uschinskische Lösung vorbildlich, worin wir die unsere Resultate beeinträchtigenden Bestandteile, Ammon. lacticum, Natrium asparaginicum und vor allem Glycerin, wegließen. Ist doch die intensive Zersetzung des Glycerins und das Auftreten mannigfacher Zersetzungsprodukte desselben unter dem Einfluß von Bakterien durch die Arbeiten von v. Sommaruga,<sup>1)</sup> Fitz,<sup>2)</sup> Vandevelde<sup>3)</sup> und Frankland<sup>4)</sup> genugsam erwiesen. Es fanden sich nach ihnen eine große Anzahl von Fettsäuren und Äthylalkohol als Zerlegungsprodukte.

Eine Hemmung des Bakterienwachstums infolge der Ausschaltung von Phosphat und der oben erwähnten Bestandteile brauchten wir nicht zu fürchten, da doch mit der Nucleinsäure C, P, N und Kohlenhydrat als Nahrung geboten wird. Zudem haben wir bei früheren Versuchen mit ähnlich zusammengesetzten Nährlösungen die Erfahrung gemacht, daß die Bakterien darin vorzüglich gedeihen.

Die oben erwähnte, auf neutrale Reaktion eingestellte, durch dreistündige Sterilisation im Dampftopf vorbereitete Lösung wurde täglich mit einer frischgezüchteten Colireinkultur geimpft. Nach 5tägigem Stehen im Brutschrank bei 37° wurde die nunmehr stark alkalisch reagierende, ammoniakalisch riechende Lösung auf Ammoniak und Alkohol geprüft.

Zum Ammoniaknachweis wurde eine kleine Probe nach Art der von Schittenhelm<sup>5)</sup> modifizierten Krüger-Reichschen Methode bei 42° im Vacuum destilliert. Das salzsauer eingedampfte Filtrat gab mit wenig Wasser aufgenommen und mit Platinchloridlösung versetzt die charakteristischen Kristalle des Ammoniumplatinchlorids: Es war also durch bakterielle Zersetzung des Nährbodens Ammoniak gebildet worden.

Eine andere kleine Probe des Reaktionsgemisches wurde mit Hilfe der Jodoform- und der Kaliumbichromat-Schwefelsäureprobe auf Alkohol untersucht. Das Resultat fiel positiv aus.

<sup>1)</sup> Zeitschrift f. Hygiene und Inf.-Krankh., 1903. Bd. 15, S. 304.

<sup>2)</sup> Berichte d. deutsch. chem. Gesellschaft, Bd. 17, S. 1188.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. VIII, S. 367.

<sup>4)</sup> Proc. Lond., 1889, S. 345.

<sup>5)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 73.

Die Hauptmenge wurde durch ein Bakterienfilter gesaugt und zum Nachweis eventuell gebildeter toxischer Substanzen 1 ccm des Filtrats einer Maus subkutan injiziert. Es machten sich keinerlei Intoxikationserscheinungen wahrnehmbar.

Die ganze Menge des Filtrates wurde mit wenig Natronlauge versetzt und einer Wasserdampfdestillation unterworfen.

Destillat A.

Rückstand B.

Das Destillat A roch unangenehm stark ammoniakalisch. Salzsauer eingedampft, blieb ein rein weißer Rückstand, der mit absolutem Alkohol ausgezogen wurde. Der unlösliche Rückstand war Chlorammon, was mit Hilfe des Platindoppelsalzes leicht festgestellt wurde. Der alkoholische Auszug gab mit Chloroform und Kaliumhydroxyd eine positive Isonitrilreaktion, die sich durch einen merklichen, höchst unangenehmen Geruch zu erkennen gab. Um das damit nachgewiesene Amin näher zu charakterisieren, reichte das Material nicht aus.

Der Rückstand B wurde phosphorsauer gemacht und mit Wasserdampf destilliert.

Destillat C.

Rückstand D.

Im Destillat konnte Ameisensäure durch Reduktion einer ammoniakalischen Silberlösung nur in Spuren nachgewiesen werden. Durch das reichliche Impfen mit Bakterien und deren gutes Wachstum war offenbar die Zersetzung schon weiter gefördert worden. Essigsäure und die folgenden Säuren der Fettreihe waren nicht vorhanden.

Der Rückstand D wurde mit einem Gemisch von 1 Teil Methylalkohol und 2 Teilen Äther wiederholt ausgeschüttelt und die Ätherschicht im Scheidetrichter abgetrennt. Darnach wurden 10 ccm destilliertes Wasser hinzugegeben und das Äther-Methylalkoholgemisch abdestilliert. Der wässrige Rückstand wurde mit einer Chlorcalciumlösung versetzt und stehen gelassen. Am anderen Tage hatten sich sehr spärliche Mengen eines weißen Niederschlages abgesetzt, der unter dem Mikroskop die briefkuvertartigen Kristalle des oxalsauren Kalkes aufwies. Es waren somit geringe Mengen von Oxalsäure festgestellt.

Eine wesentliche Rolle unter den Zersetzungsprodukten der Nucleinsäure spielen die Purinbasen. Bei einem Spaltungsversuche unseres Präparates von hefenucleinsaurem Natrium, bei dem eine Lösung von 20 g dieses Salzes in 1000 ccm Wasser mit 40 ccm konzentrierter Schwefelsäure vier Stunden lang am Rückflußkühler erhitzt wurden und dann eine Trennung der hierdurch abgespaltenen Basen nach dem von Krüger und Schittenhelm<sup>1)</sup> benutzten Verfahren sich anschloß, fanden wir folgende Basenmengen:

Guanin	0.23 g
Adenin	1.23 »
Hypoxanthin	0.15 »
Xanthin	0.0 »

Aus diesen Zahlen ist ersichtlich, daß in unserem Präparate als basische Komponenten vornehmlich Adenin und Guanin sich fanden. Nach der Spaltung durch Bakterien erwies sich jedoch, daß Adenin und Guanin verschwanden, dafür aber Hypoxanthin und besonders Xanthin in beträchtlichen Mengen auftraten.

Zur Untersuchung auf die Purinbasen benutzten wir das Reaktionsgemisch vom Gasversuch I (Mitteilung III), wobei 60 g nucleinsaures Natrium durch ein Bakteriengemisch innerhalb 10 Tagen gespalten wurden. Die von Bakterien abfiltrierte Flüssigkeit (ca. 6 Liter) wurde auf ungefähr 2000 ccm eingengt und die Basen mittels Silberfällung daraus isoliert. Nachdem der Niederschlag mit Salzsäure zerlegt war, wurde das Filtrat zur Trockene eingedampft und mit Wasser aufgenommen. Da die Lösung stark gefärbt war, wurde eine nochmalige Basenfällung mit Natriumbisulfit-Kupfersulfat vorgenommen. Der abfiltrierte Kupferniederschlag wurde im Wasser suspendiert, mit Schwefelwasserstoff zersetzt, vom Schwefelkupfer filtriert und salzsauer eingedampft. Mit heißem Wasser wurde hernach der Rückstand wieder gelöst und die Lösung stark ammoniakalisch gemacht. Nach 24-stündigem Stehen fiel ein Niederschlag aus, der abfiltriert (Filtrat  $\alpha$ ) und nochmals mit Ammoniak kurz aufgeköcht wurde. Am anderen Tage wurde filtriert (Filtrat  $\beta$ ).

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 153.

Der Rückstand, mit wenig verdünnter Natronlauge ausgekocht und abfiltriert, erwies sich mit Hilfe der Molybdänsäurereaktion als Phosphat. Als der natronalkalische Auszug essigsauer gemacht wurde, fiel selbst nach Einengen desselben kein Niederschlag aus. Es war also kein Guanin mehr vorhanden.

Die vereinigten ammoniakalischen Filtrate  $\alpha$  und  $\beta$  wurden durch Einengen vom Ammoniak befreit und schließlich schwach salzsauer zur Trockene eingedampft. Der Rückstand, mit heißem Wasser aufgenommen, löste sich nicht vollständig, weshalb filtriert (Filtrat  $\gamma$ ) wurde. Der ungelöste Anteil wurde in verdünntem Ammoniak gelöst, mit Tierkohle entfärbt, die Tierkohle nochmals mit Ammoniak ausgekocht und die beiden vereinigten ammoniakalischen Lösungen zur Trockene eingedampft. Der Rückstand betrug 0,134 g und gab sämtliche Reaktionen des Xanthins stark positiv.

Das Filtrat  $\gamma$  wurde nach Zusatz eines Tropfens Methylorange bis zur schwachen Rotfärbung mit Salzsäure und hernach mit Natriumpikrat versetzt, wobei keine Färbung eintrat. Es war mithin kein Adenin vorhanden.

Zur Entfernung der Pikrinsäure wurde die Lösung stark salzsauer gemacht und mit Benzol ausgeschüttelt, bis jede Spur von Färbung verschwunden war. Die pikrinsäurefreie Flüssigkeit wurde eingedampft und mit Alkohol mehrmals abgedunstet, darnach der Rückstand mit heißem Wasser wieder aufgenommen und über Nacht im Eisschrank stehen gelassen. Am anderen Morgen war eine körnige Substanz ausgefallen, welche durch den positiven Ausfall sämtlicher Xanthinreaktionen als Xanthin erkannt wurde. Im ganzen waren 0,156 g Xanthin isoliert worden. Zur Analyse wurde das Xanthin über das Nitrat, das die charakteristische Kristallform zeigte, gereinigt<sup>1)</sup> und in dem so gewonnenen Xanthinpräparat eine N-Bestimmung ausgeführt:

0,1050 g Substanz verbrauchten nach Kjeldahl verascht  
27,1 n/10-Normal-HCl

Berechnet für  $C_5H_4N_4O_2$ :  
36,84% N

Gefunden:  
36,13% N

Offenbar war das Xanthin noch nicht ganz rein. Um

<sup>1)</sup> Krüger-Salomon, Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 358.

daher jeden Zweifel zu beheben, wurde der kleine Rest der Base in das Silberpikrat übergeführt, welches dann auch die charakteristischen, stark lichtbrechenden, kugligen Aggregate kleiner Nadeln zeigte.

Mit dem Filtrat der Xanthinfraktion wurde eine Silberfällung vorgenommen, um das Hypoxanthin zu gewinnen. Das erhaltene Silbersalz wurde mit Salzsäure zersetzt, abfiltriert und das Filtrat zur Trockene eingedampft. Aus dem Rückstand wurde ein pikrinsaures Salz hergestellt, das die charakteristischen glänzendgelben, tafelförmigen Kristalle des Hypoxanthinpikrats zeigte. Zur Analyse wurden die erhaltenen 0,5 g mit wenig Wasser gewaschen und getrocknet:

0.1076 g Substanz verbrauchten nach vorausgegangener Reduktion mit  $ZnCl_2$  und HCl nach Kjeldahl verascht **19,75**  $n_{10}$ -Normal-HCl.

Berechnet für $C_5H_4N_4O \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH + H_2O$ :	Gefunden:
25.59% N	25.69% N.

Demnach lag Hypoxanthinpikrat vor.

Bei der weiteren Verarbeitung der Rückstände gelang es uns, nach der von Levene<sup>1)</sup> für die Darstellung von Pyrimidinbasen eingeschlagenen Methode ganz geringe Mengen zweier Körper zu isolieren, die ihren Reaktionen und den Kristallformen nach vielleicht Cytosin und Uracil sein mochten.

Das Pikrat des einen zeigte unter dem Mikroskop gelbe glänzende Säulen und besaß einen Zersetzungspunkt zwischen 230 und 250°. Mit Benzol und Schwefelsäure von der Pikrinsäure befreit, blieb eine Flüssigkeit zurück, welche nach Einengen auf dem Wasserbade mit Jodkaliumjodwismutlösung einen ziegelroten Niederschlag gab.

Das Sulfat des anderen (Uracil?) stellte sich unter dem Mikroskop in rosettenförmig angeordneten Nadelchen dar, gab aber keine zweifellos positive Weidelsche Probe. Zur weiteren Identifizierung waren die Mengen viel zu klein.

Vorliegende Untersuchungen wurden im Sommer 1903 im Laboratorium der medizinischen Klinik zu Breslau ausgeführt.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 6.