

Beitrag zur Biochemie der Protozoen.

Von
Theodor Panzer.

(Der Redaktion zugegangen am 29. Mai 1911.)

Im Winter 1910 wurden mir von Herrn Dr. Josef Fiebiger, Professor an der tierärztlichen Hochschule in Wien, die erkrankten Schwimmblasen von fünf Seefischen (*Gadus virens*, Köhler, Seelachs) zur Verfügung gestellt. Diese Schwimmblasen enthielten keine Luft, sondern waren ganz erfüllt von einer gelben, klebrigen, crèmeartigen Masse, welche der Hauptsache nach aus verschiedenen Entwicklungsstadien einer Coccidienart, der *Goussia gadi*, bestand. Was die zoologische Beschreibung dieses Protozoons anbetrifft, verweise ich auf die bezügliche Abhandlung Prof. Fiebigers.¹⁾

Aus dieser, sowie aus mündlichen Mitteilungen Prof. Fiebigers entnehme ich folgende, mir für den Gegenstand dieser Abhandlung wichtig erscheinenden Details.

Das Auftreten der *Goussia* in der Schwimmblase, welches nicht gerade zu den Seltenheiten gehört, scheint in der Regel keine schwerere Erkrankung des Fisches zu bedingen. Mitunter werden jedoch Veränderungen in der Haut (Schuppenausfall) und sogar Hautgeschwüre, ferner auch eine Atrophie der Muskulatur des Schwanzteiles beobachtet. Die Schwimmblase selbst zeigt, abgesehen vom Inhalt, bei Betrachtung mit freiem Auge keine auffallende Veränderung; auch an histologischen Präparaten finden sich keinerlei Anzeichen einer Entzündung; die Coccidien dringen wohl durch die Endothelschicht bis in die darunterliegende Gefäßschicht der Schwimmblase ein, lassen aber die nächste Schicht derselben, die fibröse

¹⁾ Annalen des k. k. Naturhistorischen Hofmuseums, Wien 1907.

Schichte, intakt. Der größte Teil der Coccidien lebt frei in der Höhle der Schwimmblase.

Bei der Untersuchung des Schwimmblaseninhaltes unter dem Mikroskope findet man außer den verschiedenen Entwicklungsformen der *Goussia* nur krümlige, detritusähnliche Massen.

Da die Schwimmblase der Fische normalerweise nur mit Luft erfüllt ist und keine Anzeichen von Exsudat sich finden, so erscheint es wohl ganz rätselhaft, wovon die nicht gerade ins Gewebe eingedrungenen Coccidien sich ernähren, es könnte höchstens daran gedacht werden, daß ein im normalen Zustande kaum wahrnehmbares Sekret der Schwimmblase den Tierchen als Nahrung dient.

Nach alledem scheint der Schwimmblaseninhalt nur aus Coccidien und deren Exkreten zu bestehen, sodaß man füglich hier von dem bisher noch gewiß selten beobachteten Fall einer Reinkultur von parasitisch lebenden Protozoen sprechen kann.

Es schien mir daher interessant genug, dieses Material einer chemischen Untersuchung zu unterziehen, zumal da über die chemische Zusammensetzung von Protozoen und über deren Stoffwechsel nur äußerst dürftige Anschauungen bestehen, wie die folgende:

Sowie auch bei anderen Coccidien findet sich bei der *Goussia gadi* eine Entwicklung von Sporen, welche in dem mir zur Verfügung gestellten Material ziemlich reichlich vertreten waren, und welche sich durch eine besonders dicke Kapsel auszeichneten. Solche Kapseln sollen nach den verschiedenen Anschauungen aus Keratin, nach anderen aus Chitin bestehen. Demgegenüber hat mir Herr Prof. Fiebiger in liebenswürdiger Weise seine Beobachtung mitgeteilt, daß sich diese Kapseln mit Kernfärbemitteln gut anfärben. Ich wandte daher der Substanz der Kapseln besondere Aufmerksamkeit zu; die Gelegenheit bot sich um so mehr, als es mir durch einen Zufall gelungen war, die Sporen von allen übrigen Bestandteilen des Untersuchungsobjektes zu trennen.

Der Inhalt der Schwimmblasen kam in frischem Zustande zur Untersuchung: die Fische waren frisch von der See eingetroffen. Die Schwimmblasen wurden eröffnet und der klebrige

Inhalt wurde mit einem Glaslöffel herausgekratzt, wobei es sich nicht vermeiden ließ, daß kleine Partikelchen der Intima der Schwimmblase mitgingen, obwohl auf die der Schwimmblasenhaut anhaftenden Partien von vornherein verzichtet werden sollte. So wurden zusammen 516 g Substanz gewonnen. Einzelne Schwimmblasen lieferten 170 g, 160 g und 100 g.

Zur allgemeinen Orientierung wurde aus dem gleichmäßig gemischten Material die Summe der festen Bestandteile, die Asche¹⁾ und der Gesamtstickstoff²⁾ bestimmt. Es ergab sich in Prozenten:

Wasser	85,93%
Feste Stoffe	14,07%
Organische Stoffe	12,87%
Stickstoff	1,25%
Unorganische Stoffe	1,20%

Eine Umrechnung der gefundenen Stickstoffmenge auf Eiweiß erschien mangels jeglichen Anhaltspunktes für den Stickstoffgehalt der Eiweißstoffe in diesem Material nicht angängig.

Ein weiterer Vorversuch, welcher hauptsächlich über das Vorkommen von Nucleoproteiden orientieren und damit einen Anhaltspunkt dafür liefern sollte, ob die Kapseln der Sporen, worauf deren Färbbarkeit durch Kernfarbstoffe zu deuten schien, aus Nucleoproteid bestehen, wurde folgendermaßen angestellt: 100 g des gemischten Materials wurden mit sehr verdünntem Ammoniak ausgezogen; die filtrierte Lösung setzte beim Ansäuern mit Essigsäure eine mäßige Menge eines flockigen, gelblichen Niederschlages ab, welcher nach zweimal wiederholtem Lösen in sehr verdünntem Ammoniak und Fällen mit Essigsäure die Biuretreaktion zeigte, aber sich frei von Phosphor erwies. Nach vierstündigem Erhitzen des Niederschlages mit verdünnter Salzsäure im Wasserbade reduzierte die resultierende Flüssigkeit Fehlingsche Lösung stark. Es liegt demnach ein Glykoproteid vor.

¹⁾ 6,4041 g Substanz: 0,9008 g Trockensubstanz (bei 105° getrocknet) und 0,0768 g Asche.

²⁾ 1,0007 g Substanz verbrauchen nach Kjeldahl 8,6 ccm Lauge (1 ccm 0,1030 ccm Normal).

Ich unterlasse nicht, zu bemerken, daß es mir, was die Eiweißstoffe anbetrifft, bei dieser Untersuchung hauptsächlich darum zu tun war, die Zugehörigkeit der einzelnen Eiweißstoffe zu den jetzt geltenden Eiweißgruppen festzustellen. Eine eingehendere Charakterisierung der einzelnen Eiweißstoffe sei für spätere Gelegenheit aufgespart.

Die Hauptmenge des gut gemischten Materials, 370 g. wurde nacheinander möglichst erschöpfend mit folgenden Lösungsmitteln extrahiert und dadurch in mehrere Fraktionen zerlegt:

1. mit 95%igem Alkohol: das feuchte Material wurde mit der zehnfachen Menge 95%igem Alkohol angerührt, nach eintägigem Stehen wurde filtriert und das Ungelöste mit 95%igem Alkohol ausgewaschen:

2. mit Äther: das in Alkohol ungelöst Gebliebene wurde, nachdem der Alkohol bei Zimmertemperatur verdunstet war, durch 3 Tage im Soxhletschen Apparate mit Äther extrahiert:

3. mit Wasser:

4. mit sehr verdünntem Ammoniak;

5. mit 0,1%iger Salzsäure:

6. mit 0,1%iger Kalilauge:

7. mit siedendem Wasser, nachdem vorher die anhaftenden Spuren von Lauge durch Aufschwemmen in Wasser und sehr verdünnte Essigsäure und jedesmal nachfolgendes Filtrieren und schließliches Auswaschen des Ungelösten entfernt worden waren; schließlich blieb

8. ein in all den genannten Extraktionsmitteln ungelöst gebliebener Rückstand.

1. Alkoholische Lösung.

Die alkoholische Lösung wurde auf dem Wasserbade verdampft, der Abdampfrückstand mit Wasser aufgenommen und wiederholt mit immer neuen Ätherportionen ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherlösungen wurden anderseits wiederholt mit immer erneuerten Wassermengen ausgeschüttelt.

In beiden Lösungsmitteln blieb nur eine sehr geringe Menge harziger Substanz ungelöst.

Die vereinigten wässrigen Lösungen enthielten beträchtlichere Mengen gelöster Stoffe, doch konnte aus diesem Gemenge keine Substanz in reinem Zustande abgeschieden, noch auch in dem Gemenge charakterisiert werden. Insbesondere wies das Verhalten dieses Gemenges auf das Fehlen jeglichen echten Kohlenhydrates (auch der Pentosen hin), dagegen war nach dem Verhalten gegen Fehlingsche Lösung die Anwesenheit von Mannit zu vermuten.

Den vereinigten Ätherlösungen wurde durch Schütteln mit sehr verdünnter Salzsäure eine sehr geringe Menge einer in farblosen Nadeln krystallisierenden Base, durch Schütteln mit verdünnter Sodalösung eine ganz beträchtliche Menge von freien Fettsäuren, durch Schütteln mit sehr verdünnter Natronlauge eine sehr geringe Menge einer farblosen, krystallisierten, phenolartigen Substanz von scharfem, unangenehmen Geruche entzogen, welche nicht die für das Indol charakteristischen Reaktionen zeigte. Der mit den genannten drei Lösungsmitteln erschöpfte Äther enthielt dann nur mehr eine als «Neutralfett» zu bezeichnende Substanz.

Die freien Fettsäuren repräsentierten eine gelbe, fettige, z. T. krystallinische Substanz und zeichneten sich durch ein niederes Durchschnittsmolekulargewicht und die Beimengung nur mäßiger Mengen ungesättigter Säuren aus.

0,3080 g Fettsäuren verbrauchten bei der Titration 13,7 ccm Lauge (1 ccm = 0,1002 ccm normal): Molekulargewicht 224,8.

0,5825 g Fettsäuren, nach der Methode von Parker Mc Ilhiney¹⁾ behandelt, addierten eine Brommenge, entsprechend 19,1 ccm Thiosulfatlösung (1 ccm = 0,0996 ccm normal): Jodzahl 41,4, auf Ölsäure berechnet entsprechend 46,1% Ölsäure.

Dieses Molekulargewicht und die Jodzahl erscheinen darum auffällig, weil den in Fischfetten enthaltenen Fettsäuren in der Regel ein höheres Molekulargewicht und eine viel höhere Jodzahl zukommt. (Dorschlebertran: Molekulargewicht der Fettsäuren 287,6—292,5, Jodzahl der Fettsäuren 164,9—170,1),²⁾

¹⁾ Hans Meyer, Analyse und Konstitutionsermittlung organischer Verbindungen, 2. Aufl., Berlin 1909, S. 950.

²⁾ Benedikt-Ulzer, Analyse der Fette, 4. Aufl., Berlin 1903, S. 723.

doch darf hier nicht vergessen werden, daß die beschriebene Untersuchung sich nur auf die freien Säuren und nicht auf die gesamten Fettsäuren bezog.

Die als «Neutralfett» bezeichnete Fraktion bestand, wie die nähere Untersuchung lehrte, der Hauptsache nach aus Cholesterin und Estern des Cholesterins. Diese Fraktion bildete nach dem Verdunsten des Äthers eine farblose, fast durchwegs in Blättchen krystallisierte Substanz, im Gewichte von 1,4 g, welche nach der an einer Spur vorgenommenen Probe die Liebermannsche Cholestolreaktion zeigte. Die Substanz wurde in Alkohol gelöst und nach Windaus¹⁾ mit Digitonin ausgefällt. Die Menge des gewaschenen und getrockneten Digitonincholesterids betrug 1,30 g, entsprechend 0,316 g freiem Cholesterin. Das durch siedendes Xylol aus dem Cholesterid extrahierte²⁾ und aus Alkohol umkrystallisierte Cholesterin zeigte die für gewöhnliches tierisches Cholesterin charakteristische Krystallform und auch den entsprechenden Schmelzpunkt (144° C.).

Die von dem Digitonincholesterid abfiltrierte Flüssigkeit samt Waschflüssigkeit wurde nach dem Einengen auf dem Wasserbade und nach Zusatz von Äther durch Schütteln mit Wasser von dem im Überschuß zugesetzten Digitonin befreit; der Äther hinterließ beim Verdunsten einen zum größten Teile aus farblosen, langen Krystallnadeln bestehenden Rückstand, denen etwas gelbes Öl beigemischt war.

Der gesamte Rückstand wurde in Benzol gelöst und durch Eintragen von Natriummetall und absolutem Alkohol verseift. Die aus den Seifen dargestellten Fettsäuren waren z. T. fest, z. T. flüssig, sie addierten, in Chloroform gelöst, Brom.

Das von den Seifen abfiltrierte und wiederholt mit Wasser ausgeschüttelte Benzol hinterließ beim Verdunsten 0,4 g eines größtenteils krystallinischen Rückstandes, welcher die Cholestolreaktion zeigte.

0,35 g dieses Rückstandes, der Digitoninbehandlung unter-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 65, S. 110.

²⁾ In allen hier kurz angeführten Operationen hielt ich mich genau an die Windausschen Vorschriften.

worfen, lieferten 0,95 g Digitonincholesterid, entsprechend 0,231 g Cholesterin, als Ausdruck für das mit Fettsäuren zu Estern verbundene Cholesterin. Das durch Xylolextraktion wiedergewonnene Cholesterin entsprach nach Krystallform und Schmelzpunkt (145° C.) wieder dem gewöhnlichen tierischen Cholesterin.

Um zu erfahren, was ungefähr der nicht aus Cholesterin bestehende Anteil (0,14 g) des «unverseifbaren Rückstandes» sein könnte, wurde dieser Anteil aus der vom Digitonincholesterid abfiltrierten Flüssigkeit in der angedeuteten Weise nach Entfernung des Digitonins wiedergewonnen. Er bildete ein farbloses, zähflüssiges, von farblosen Krystallen untermischtes Öl, welches im Wasser unlöslich war, sich in konzentrierter Schwefelsäure zu violett gefärbter Lösung löste und die Cholestolreaktion zeigte.

Es finden sich also auch hier Alkohole ähnlich denen, wie ich sie schon bei meinen Untersuchungen über doppeltbrechende Substanzen aus pathologischen Organen vom Menschen gefunden und beschrieben¹⁾ habe, obwohl mir damals die gerade hier so bequeme Digitoninmethode noch nicht zur Verfügung stand. Ob die Cholesterinreaktionen der aus den Protozoen gewonnenen Alkohole auf die Beimengung kleiner Mengen von Cholesterin zurückzuführen seien, welche auch bei Anwendung eines Überschusses von Digitonin der Fällung entgehen, oder den Alkoholen selbst zukommen, darüber wage ich keine Vermutung zu äußern.

2. Äther von der Extraktion im Soxhletschen Apparate.

Diese Ätherlösung wurde ebenso behandelt wie die im vorhergehenden Abschnitt beschriebene in Äther gelöste Fraktion. Es fand sich hier wiederum die basische Substanz, welche dem Äther durch Schütteln mit verdünnter Salzsäure entzogen werden konnte; hier gelang es, aus dieser Base eine krystallisierte, in Wasser schwer lösliche Platindoppelverbindung darzustellen.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 54, S. 239.

Auch die durch Schütteln mit Lauge extrahierbare phenolartige Substanz kehrte wieder.

Ferner wurden wieder größere Mengen freier Fettsäuren gewonnen.

Die nach der Darstellung als «Neutralfett» zu bezeichnende Fraktion war ziemlich beträchtlich; sie wog 3,5 g und war größtenteils krystallinisch. Sie wurde in zwei gleiche Hälften geteilt.

Die eine Hälfte diente hauptsächlich zur quantitativen Bestimmung des Cholesterins, während die andere für qualitative Versuche verwendet wurde. Das Fett zeigte starke Cholestolreaktion, es erwies sich frei von Phosphor; der noch übrige Rest dieser Hälfte wurde in siedendem Aceton gelöst, beim Erkalten schied sich eine verhältnismäßig geringe Menge von Cholesterinfettsäureestern ab.

Die zur quantitativen Cholesterinbestimmung gewidmete Hälfte des Fettes wurde in Benzol gelöst und durch Eintragen von Natrium und absolutem Alkohol verseift.

Die Fettsäuren, welche dabei gewonnen wurden, enthielten wieder viel ungesättigte Säure, sie addierten reichlich Brom und zeigten einen an marinierten Aal erinnernden Geruch.

Der «unverseifbare Rückstand» betrug 0,65 g, er hatte eine gelbbraunliche Farbe und bestand fast durchwegs aus Krystallen.

0,2 g dieses «unverseifbaren Rückstandes» lieferten nach der Digitoninmethode 0,57 g Cholesterid entsprechend 0,139 g Cholesterin, aus welchem durch siedendes Xylol wieder gewöhnliches tierisches Cholesterin vom Schmelzpunkte 145° C. extrahiert werden könnte.

Die von dem Digitonincholesterid abfiltrierte alkoholische Flüssigkeit enthielt ebenfalls andere Alkohole, welche, nachdem sie in der bereits beschriebenen Weise isoliert worden waren, eine farblose, dickflüssige, ölige, in Wasser unlösliche Substanz bildeten; sie zeigten die Cholestolreaktion und lösten sich in konzentrierter Schwefelsäure zu einer roten Flüssigkeit.

Die Ergebnisse der eben beschriebenen quantitativen Bestimmungen sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Die in Arbeit genommenen 370 g Coccidiensubstanz lieferten:

	1. im Alkohol- auszug g	2. im Äther- auszug g	Zu- sammen g	In Pro- zenten
«Neutralfett»	1,4	3,5	4,9	—
«Unverseifbarer Rückstand» .	0,72	1,30	2,02	0,55
Cholesterin {	frei	—	—	—
	in Estern	0,26	—	—
	zusammen	0,58	0,90	1,48
Andere, in Wasser unlösliche Alkohole	0,14	0,40	0,54	0,15

Von dem «unverseifbaren Rückstande» waren in Prozenten:

Cholesterin 73 0/0

andere Alkohole 27 0/0.

Der «unverseifbare Rückstand» betrug rund $\frac{2}{5}$ des «Neutralfettes». Die Zusammensetzung des Gesamtfettes der Coccidien-substanz vervollständigten endlich noch ganz beträchtliche, nicht näher bestimmte Mengen freier Fettsäuren.

3. Lösung in Wasser.

Aus dieser neutral reagierenden Lösung ließen sich zunächst durch Ansäuern mit Essigsäure kleine Mengen des im Vorversuche beschriebenen phosphorfreien Glykoproteids abscheiden, ferner aus dem Filtrate durch Fällen mit Alkohol kleine Mengen einer amorphen Substanz, welche die Biuretreaktion zeigte, beim Kochen ihrer wässrigen Lösung nicht koagulierte und durch halbe Sättigung mit schwefelsaurem Ammonium aus dieser nicht ausgesalzen wurde.

Das alkoholische Filtrat, durch Einengen auf dem Wasserbade vom Alkohol befreit, erwies sich als eiweißfrei (Biuretreaktion) und wurde nacheinander mit Bleizucker, Bleiessig und Bleiessig und Ammoniak ausgefällt. Keiner dieser drei Bleiniederschläge lieferte beim Zerlegen mit Schwefelwasserstoff eine reduzierende Substanz. Die Stoffe, welche die Bleifällung eingegangen waren, dürften nach ihrem Verhalten gegen Reagenzien nebst Aschenbestandteilen organische Säuren gewesen sein.

Das letzte bleihaltige Filtrat wurde, nachdem das Blei

durch Schwefelwasserstoff entfernt worden war, auf dem Wasserbade verdampft: es hinterließ verhältnismäßig viel hellgelben Sirup von melasseähnlichem Geruch. Nach mehreren vergeblichen Versuchen, aus diesem, wohl zum großen Teile aus essigsaurem Ammonium bestehenden Sirup einzelne Individuen zu isolieren, wurden mit der wässerigen Lösung des Sirups verschiedene Reaktionen angestellt, von welchen nur folgende angeführt seien:

Die Lösung reduzierte Fehlingsche Flüssigkeit nicht. Auch bei mehrstündigem Kochen mit verdünnter Salzsäure (Salzsäure solange der Flüssigkeit zugesetzt, bis sie Methylviolettlösung deutlich grün färbte) bildete sich keine reduzierende Substanz.

In der Lösung des Sirups erzeugte kalte Fehlingsche Flüssigkeit, noch reichlicher aber ammoniakalische Kupfervitriollösung, mit nur geringem Ammoniaküberschuß bereitet, einen hellblauen Niederschlag (Reaktion auf Mannit).

Wurde zur Lösung des Sirups Jodlösung zugetropft, so wurden die ersten Tropfen Jodlösung entfärbt, die weiteren Tropfen erzeugten eine rotbraune Färbung (ähnlich wie in Glykogenlösungen).

4. Lösung in sehr verdünntem Ammoniak.

Diese Lösung schied beim Ansäuern mit Essigsäure noch eine kleine Menge des vorerwähnten Glykoproteids ab.

5. Die Lösung in $\frac{1}{10}$ °iger Salzsäure zeigte nur schwache Biurettreaktion und blieb bei genauem Neutralisieren mit Sodalösung klar.

6. Die Lösung in $\frac{1}{10}$ °iger Kalilauge zeigte ebenfalls nur schwache Biurettreaktion und wurde beim Neutralisieren mit Salzsäure nur ein wenig getrübt.

7. Die Lösung in heißem Wasser hinterließ beim Verdampfen auf dem Wasserbade ziemlich viel Rückstand, welcher sich in seinen physikalischen Eigenschaften wie Leim verhielt; insbesondere verwandelten sich konzentriertere, mit heißem Wasser bereitete Lösungen beim Erkalten in Gallerten.

Die Substanz zeigte die Biuretreaktion, die Millonsche Reaktion, die Xanthoproteinsäurereaktion und die Molischsche Reaktion (mit α -Naphthol). Die Adamkiewiczsche Reaktion fiel nun sehr schwach aus, bleischwänzender Schwefel fehlte. Aus der wässerigen Lösung wurde dieser Leim gefällt durch Alkohol, durch das gleiche Volumen konzentrierter Lösung von schwefelsaurem Ammonium, durch Metaphosphorsäure. Konzentrierte Salpetersäure fällte nicht. Lösungen von Kupfervitriol, Bleiessig und Silbernitrat erzeugten nur Trübungen.

In der mit Essigsäure angesäuerten Lösung rief gelbes Blutlaugensalz einen Niederschlag hervor, welcher sich schon in geringem Überschuße des gelben Blutlaugensalzes wieder auflöste.

Im allgemeinen darf wohl der vorliegende Eiweißstoff als ein Glutin angesprochen werden. Einige der Unterschiede, welche dieses Glutin gegenüber dem gewöhnlichen, peinlichst gereinigten tierischen Leim aufweist, mögen ja vielleicht darauf zurückzuführen sein, daß der Coccidienleim durch die vorhergegangenen, allerdings ziemlich mannigfaltigen Extraktionen doch noch nicht ganz von fremden Beimengungen befreit worden war. Einzelne Reaktionen (Ferrocyankwasserstoff, Millon, Xanthoproteinsäure) weisen aber durch ihre Deutlichkeit darauf hin, daß der Coccidienleim etwas wesentlich anderes ist, als das gewöhnliche Glutin.

8. Der in den bisher angewendeten Extraktionsmitteln ungelöst gebliebene Rückstand.

Dieser Rückstand bestand, wie die mikroskopische Untersuchung lehrte, ausschließlich aus Sporen der *Goussia*, welche gegenüber ihrem ursprünglichen Zustande keinerlei Veränderungen erkennen ließen; alle anderen Gebilde des Ausgangsmateriales waren herausgelöst worden.

Die Kapsel dieser Sporen erscheint unter dem Mikroskope so dick, daß wohl die Kapsel den größeren Anteil der Masse der Spore bildet, während nur der geringere Anteil, schätzungsweise ein Drittel, auf zwei in jeder Spore enthaltene, ineinander verschlungene Sporozoiten kommt.

Auf die Möglichkeit, die Sporen zum Platzen zu bringen,

um die darin enthaltenen einzelligen Organismen herauszulösen und so die Substanz der Kapsel rein zu bekommen, wurde nach einigen vergeblichen Vorversuchen verzichtet und ein anderer Weg, die Auflösung der ganzen Spore, eingeschlagen. Als geeignetes Lösungsmittel erwies sich 2%ige Kalilauge.

Als die Sporen bei Zimmertemperatur durch 24 Stunden mit solcher Lauge behandelt wurden, lösten sie sich bis auf einen sehr geringen, farblosen Rest vollkommen auf.

Dieser Rest enthielt, unter dem Mikroskope betrachtet, keine unveränderten Sporen oder Sporozoiten mehr, sondern bestand durchwegs aus farblosen Körnchen, welche, abgesehen von der Farbe, etwa wie Stechapfelformen der roten Blutkörperchen aussahen und jedenfalls winzige Krystalldrüsen waren. Sie zeigten weder die Biuretreaktion, noch die Millonsche Reaktion. Beim Erhitzen verbrannten sie und hinterließen eine aus Calciumoxyd nebst Spuren von Schwefelsäure bestehende Asche. Aus oxalsaurem Calcium bestanden diese Körnchen nicht; denn sie lösten sich in verdünnter Salzsäure nur teilweise und die filtrierte Lösung blieb auf Zusatz von Ammoniak klar. Es handelt sich vermutlich um das Calciumsalz einer anderen organischen Säure.

Die filtrierte Lösung der Sporen mußte also außer der Kapselsubstanz noch die Bestandteile der Sporozoiten bezw. deren Veränderungsprodukte enthalten. Da wohl vermutet werden durfte, daß die Sporozoiten als einzellige Organismen aus den gewöhnlichen Zellbestandteilen bestehen, so dürfte wohl alles, was in größerer Menge gefunden wurde und nicht Albumose, Nucleoproteid bezw. Nucleinsäure oder Histon war, ohne eingehendere Untersuchung als Substanz der Kapsel angesprochen werden. Nun schied die Lösung beim Zusatz von Essigsäure bis zur deutlich sauren Reaktion einen reichlichen Niederschlag ab, daß dieser wohl, abgesehen von Verunreinigungen, die Kapselsubstanz repräsentieren mußte, während in der von diesem Niederschlag abfiltrierten Flüssigkeit im wesentlichen die Bestandteile der Sporozoiten oder deren Veränderungsprodukte enthalten waren.

Dieses Filtrat zeigte starke Biuretreaktion, sowie noch

eine ganze Reihe anderer Eiweißreaktionen, deren Beschreibung zur Vermeidung von Wiederholungen hier unterdrückt werden kann, welche aber auf die Anwesenheit von albumoseartigen Substanzen hinwiesen.

Eine Probe des Filtrates, zur Trockene verdampft, hinterließ einen Abdampfungsrückstand, welcher frei von Phosphor und bleischwärendem Schwefel war, Fehlingsche Lösung nicht reduzierte und keine Xanthinbasen enthielt (die konzentrierte wässrige Lösung blieb auf Zusatz von ammoniakalischer Silberlösung klar).

Eine zweite Probe wurde gegen destilliertes Wasser dialysiert und der neutral reagierende Inhalt der Dialysierhülse auf die Anwesenheit von Histonen geprüft und zwar mit negativem Erfolg: die dialysierte Flüssigkeit blieb beim Kochen klar, ebenso auf Zusatz von Ammoniak oder Hühnereiweißlösung; konzentrierte Salpetersäure erzeugte eine Trübung, welche beim Erwärmen verschwindet, beim Erkalten wieder auftritt; die allgemeinen Alkaloidreagenzien (Kaliumquecksilberjodid, Jodjodkalium, Phosphorwolframsäure) erzeugen keine Niederschläge, die Niederschläge treten erst auf, wenn außerdem eine Säure zugefügt wird.

Die in der Lösung vorhandenen Albumosen konnten in zwei an Menge ungefähr gleiche Fraktionen zerlegt werden, eine in Alkohol lösliche und eine in Alkohol unlösliche. Zu diesem Zwecke wurde der noch verfügbare Rest des wässrigen Filtrates auf dem Wasserbade bis auf etwa 10 ccm eingengt und dann mit $\frac{3}{4}$ l absolutem Alkohol versetzt; diese verhältnismäßig große Menge Alkohol war notwendig, um einen Niederschlag zu erzeugen.

Der entstandene Niederschlag wurde auf einem Filter gesammelt, mit Alkohol ausgewaschen; nach dem Verdunsten des Alkohols löste er sich im Wasser leicht zu einer neutral reagierenden Lösung.

Filtrat und Waschflüssigkeit wurden auf dem Wasserbade zur Trockene verdampft. Die wässrige Lösung dieses leicht löslichen Abdampfrückstandes reagierte wohl infolge von anhaftender Essigsäure sauer.

Das Verhalten des Niederschlages einerseits, des Abdampfrückstandes des alkoholischen Filtrates andererseits bei den angestellten Eiweißreaktionen zeigt folgende Tabelle.

	Niederschlag	Abdampfrückstand des Filtrates		
Biuretreaktion	positiv	positiv		
Millonsche Reaktion . . .	„	„		
Xanthoproteinsäurereaktion	negativ	negativ		
Adamkiewiczsche Reaktion	„	„		
Molischsche Reaktion (mit α -Naphthol)	„	„		
Bleischwärender Schwefel .	fehlt	fehlt		
Phosphor	„	„		
Koagulation beim Kochen .	„	„		
Konzentrierte Salpetersäure .	Trübung, beim Erwärmen verschwindend	Trübung, beim Erwärmen verschwindend		
Ferrocyanwasserstoffsäure .	Niederschlag, beim Erwärmen teilweise löslich	Niederschlag, beim Erwärmen teilweise löslich		
Kaliumquecksilberjodid Jodjodkalium Phosphorwolframsäure	erst nach dem Ansäuern mit Essigsäure Niederschläge	Niederschläge (NB. die Lösung reagiert von Hause aus sauer)		
Konzentrierte Lösung von schwefelsaurem Ammonium			gleiches Volumen (= Halbsättigung)	Niederschlag
			halbes Volumen (= Drittsättigung)	kein Niederschlag
		Niederschlag		

Ein Unterschied der beiden Albumosenfraktionen besteht demnach nur im Verhalten bei der Sättigung mit schwefelsaurem Ammonium.

Bei der Untersuchung der Kapselsubstanz, welche im wesentlichen den durch Essigsäure abgeschiedenen Niederschlag bildete, leiteten zunächst die eingangs erwähnten Vermutungen, nach welchen die Kapselsubstanz aus Keratin, Chitin oder Nucleoproteid bestehen konnte, von welchen insbesondere auf die beiden letzteren das Hauptaugenmerk ge-

richtet wurde; doch durfte nicht übersehen werden, daß auch Nucleoproteid bzw. Nucleinsäure, welche aus den Sporozoiten stammte, diesem Niederschlage beigemischt sein konnte.

In der Tat enthielt dieser Niederschlag auch eine allerdings recht dürftige Menge von Phosphor.

Beim Erhitzen verbrannte der getrocknete Niederschlag vollständig, ohne Asche zu hinterlassen. Er erhielt reichlich Stickstoff und war frei von Schwefel; er zeigte wohl die Biuretreaktion, nicht aber die Millonsche Reaktion.

Zur Prüfung auf Chitin und andere kohlenhydratähnliche Stoffe wurden mit dem Niederschlage folgende Proben angestellt:

1. Eine Probe des Niederschlages wurde mehrere Stunden mit 2^oiger Salzsäure gekocht: die Flüssigkeit reduzierte dann Fehlingsche Lösung nicht.

2. Eine zweite Probe des vorher getrockneten Niederschlages wurde bei Zimmertemperatur in konzentrierte Schwefelsäure eingetragen; nach 24 Stunden war sie nur zum Teile aufgelöst, die Lösung reduzierte nach dem Verdünnen und Neutralisieren Fehlingsche Lösung nur ganz spurenweise.

3. Verdünnte Jodlösung färbte den Niederschlag nicht auffallend.

4. Eine Probe des Niederschlages wurde unter vorsichtigem Zusatz von Lauge in Wasser gelöst, eine alkoholische Lösung von α -Naphthol zugefügt und das Gemenge mit konzentrierter Schwefelsäure unterschichtet: es trat keinerlei charakteristische Färbung auf.

Chitin oder andere kohlenhydratähnliche Stoffe lagen nicht vor.

Nach dem recht geringen Phosphorgehalt war es auch recht unwahrscheinlich, daß die Kapselsubstanz aus Nucleoproteid bestand, zumal da eine Probe des Niederschlages, mit verdünnter Salzsäure zerkoht, eine Flüssigkeit lieferte, welche nach dem Neutralisieren durch ammoniakalische Silberlösung nicht getrübt wurde.

Immerhin wurde der ganze noch verfügbare Rest, die gute Hälfte des Niederschlages, auf Nucleinsäure verarbeitet, und zwar wurde dasjenige Verfahren angewendet, mit Hilfe dessen

Bang¹⁾ die Guanylsäure aus dem Nucleoproteid des Pankreas dargestellt hat, weil durch dieses Verfahren gleichzeitig etwa vorhandenes Chitin hätte isoliert werden können.

Der Niederschlag wurde nämlich mit 250 ccm 2%iger Kalilauge durch eine halbe Stunde im Wasserbade erhitzt; es entstand eine vollkommen klare Lösung, von der Anwesenheit von Chitin konnte demnach keine Rede sein. Die noch heiße Lösung wurde mit Essigsäure exakt neutralisiert, sie trübte sich nicht und blieb auch nach dem Erkalten und 24 stündigem Stehen vollkommen klar. Nun wurde weiter Essigsäure zugesetzt und erst, als die Flüssigkeit schon stark sauer reagierte, schied sich ein reichlicher Niederschlag von dem Aussehen des in Arbeit genommenen Niederschlages ab. Die Substanz schien durch das Erhitzen mit Lauge nicht verändert, sondern nur gereinigt worden zu sein.

Die von dem Niederschlage abfiltrierte Flüssigkeit enthielt überhaupt nur wenig eiweißartige Stoffe und zeigte nach dem Einengen auf ein kleineres Volumen dieselben Reaktionen wie die Lösung der vorerwähnten, in Alkohol löslichen Albumosen.

Der Niederschlag war nunmehr vollkommen frei von Phosphor. Um ganz sicher zu gehen, wurde auch die Prüfung auf Schwefel wiederholt, sie ergab abermals die Abwesenheit dieses Elementes.

Von den für Eiweißstoffe charakteristischen Farbenreaktionen war nur die Biuretreaktion deutlich, Millonsche Reaktion und Xanthoproteinsäurereaktion waren nur spurenweise angedeutet, die Adamkiewiczsche und Molischsche Reaktion fehlte.

Wenn auch nicht gerade behauptet werden kann, daß dieser letzte Niederschlag die absolut unveränderte Kapselsubstanz repräsentiert, so läßt sich doch die Kapselsubstanz in die Gruppe der Albuminoide einreihen. Sie gehört zweifellos zu jenen keratin- oder elastinähnlichen Substanzen, welche auch die Eierschalen mancher höherer Tiere bilden. Sie

¹⁾ Diese Zeitschrift. Bd. 26. S. 133.

scheint von einer für einen Eiweißstoff sehr einfachen Konstitution zu sein. Auffallend ist das vollständige Fehlen von Schwefel.

Durch die beschriebene Untersuchung glaube ich die chemische Zusammensetzung der Coccidienkolonie soweit aufgeklärt zu haben, daß nunmehr ein aussichtsreiches Studium der einzelnen Stoffe in Angriff genommen werden kann. Dieses Spezialstudium scheint genug interessante Erfolge zu versprechen, zumal da das vorliegende Material zur Erforschung der Biochemie parasitischer Protozoen geeigneter erscheint, wie kaum ein anderes bisher bekanntes.

Stellt man die vorliegenden Resultate der chemischen Zusammensetzung höherer Tiere gegenüber, so fallen schon jetzt einige wesentliche Unterschiede ins Auge.

Das Fett dieser Protozoen zeichnet sich durch einen besondern Reichtum an freien Säuren und durch einen erheblichen Gehalt an Cholesterin aus, ein Teil des Cholesterins ist in Cholesterin-Fettsäureestern enthalten. Es macht fast den Eindruck, als ob dieses Fett die Zusammensetzung des Fettes degenerierter menschlicher Organe nachahmen würde.

Über die Kohlenhydrate dieser Coccidien kann ich nichts Positives aussagen. Alle Versuche, reduzierende Zucker oder Polysaccharide zu finden, welche in reduzierende Zucker gespalten werden, schlugen fehl. Einige Beobachtungen scheinen darauf hinzudeuten, daß hier Kohlenhydratalkohole die Rolle der Kohlenhydrate übernehmen, wie ja auch bereits wiederholt in Pilzen Mannit gefunden worden ist.

Was endlich die Eiweißstoffe betrifft, so scheinen hier einfachere Verhältnisse vorzuherrschen, als bei den höheren Tieren, sowohl in der Anzahl der vorkommenden Eiweißstoffe, als auch in deren Konstitution. Insbesondere fällt das Fehlen von Schwefel auf (bei manchen Eiweißstoffen wurde allerdings nur auf bleischwärenden Schwefel geprüft). Aufgefunden wurden:

1. ein phosphorfrees Glykoprotein,
2. eine leimgebende Substanz,

ferner in den Sporen:

3. als Substanz der Kapsel ein schwefelfreies Keratin-
bezw. elastinähnliches Albumoid,

4. aus den Sporozoiten Albumosen.

Schleimstoffe gehören zu den gewöhnlichen Vorkommnissen bei niederen Organismen, sie werden in der Regel mikroskopisch nachgewiesen als ein Sekret, welches die einzelnen Individuen umgibt und sie oft froschlauchähnlich zu Kolonien zusammenklebt. Auch die Sporen der *Goussia gadi* finden sich, in der Regel zu viert, in eine mikroskopisch als Schleim imponierende Substanz eingebettet.

Dagegen muß die Gewinnung von Leim aus den Protozoen auffallen, wo doch diese Tierchen als einzellige Organismen weder ein Stützgewebe, noch ein Bindegewebe bilden. Man möchte aus diesem Grunde fast versucht sein, der gefundenen Substanz den Namen Leim zu versagen, wenn nicht seine Fähigkeit zu gelatinieren eine so markante Ähnlichkeit mit dem gewöhnlichen tierischen Leim statuieren würde, eine Ähnlichkeit, welche sich allerdings nicht auf alle chemischen Reaktionen erstreckt.

Was endlich die aufgefundenen Albumosen betrifft, so bin ich natürlich weit davon entfernt, zu meinen, daß das Protoplasma der Sporozoiten etwa aus Albumosen bestünde. Die Albumosen sind zweifellos Veränderungsprodukte des Protoplasmas. Welcher Natur die unveränderten Eiweißstoffe dieses Protoplasmas sind, ist mir allerdings noch ganz rätselhaft, zumal da sich die sonst für das Protoplasma so charakteristischen Nucleoproteide, sowie deren Spaltungsprodukte: Nucleinsäuren, Xanthinbasen, reduzierende Zucker und Histone, weder in den Sporen, noch überhaupt in dem ganzen Untersuchungsmateriale auffinden ließen. Der einzige, noch dazu recht dürftige Befund von anscheinend organisch gebundenem Phosphor in der Kapselsubstanz kann unter solchen Umständen für die Annahme eines Nucleoproteids natürlich nicht herangezogen werden. Zur Auffindung von koagulierbaren Eiweißstoffen (Albuminen und Globulinen) war das eingeschlagene Verfahren wohl nicht geeignet. Daß aber diese Stoffe hier, wenigstens quantitativ, keine große Rolle spielen, geht daraus hervor, daß nirgends

nennenswerte Mengen von Veränderungsprodukten aufstießen (höchstens in Abschnitt 5 und 6), welche auf koagulierbares Eiweiß hätten bezogen werden können.

Alles in allem zeigt die beschriebene Untersuchung, daß sich der Chemismus dieser einzelligen Organismen in manchen Punkten wesentlich von dem der Zellen höherer Tiere unterscheidet, neuerdings eine Warnung vor dem Bestreben, Beobachtungen, welche an niederen Organismen gemacht worden sind, ohne weiteres auf die Zellen höherer Tiere zu übertragen, gerade jetzt, wo das Experimentieren mit freilebenden Protozoen (Infusorien) eben in Mode ist.

Herrn Prof. Fiebiger bin ich für die Überlassung des Untersuchungsmateriales, sowie für mannigfache zoologische und parasitologische Aufklärungen zu besonderem Danke verpflichtet.