

# Zur Chemie der Bakterien.

## II. Mitteilung.

Von

**Sakae Tamura** (Tokyo).

(Aus dem hygienischen und dem physiologischen Institut der Universität Heidelberg.)  
(Der Redaktion zugegangen am 4. Oktober 1913.)

In meiner ersten Mitteilung<sup>1)</sup> habe ich die Protoplasma-Bausteine zweier Bakterienarten, des Tuberkelbacillus und des Mykobakterium lacticola, einer Untersuchung unterworfen und festgestellt, daß sie im wesentlichen dieselben sind, wie die der höheren Lebewesen. Besonders gilt dies von denjenigen Bausteinen, aus denen sich das Proteinmolekül zusammensetzt.

An die Erkenntnis dieser Tatsache knüpft sich die Frage, ob denn der Organismus der erwähnten Bakterien auch imstande ist, alle diese verschiedenen Atomgruppen selbst zu bilden, oder ob ihm wenigstens ein Teil derselben durch den Nährboden zugeführt werden muß. Die Bakterienkulturen, welche zu meinen bisherigen Analysen gedient hatten, waren auf Pepton-Bouillon gezüchtet worden; hier war also die Möglichkeit einer Aufnahme komplizierter organischer Moleküle, besonders der Eiweißbausteine in fertigem Zustand geboten. Bei den neueren unten mitgeteilten Versuchen habe ich nunmehr die Nährlösung vereinfacht, soweit dies mit einem ausgiebigen Wachstum der genannten Bakterien verträglich war. Ich gewann so die Möglichkeit, die synthetischen Fähigkeiten der Bakterien genauer festzustellen und die Frage zu entscheiden, ob mit der Vereinfachung der Nahrung auch eine Veränderung der Zusammensetzung der Körpersubstanz, speziell im Bau der Proteinstoffe, verbunden war. Zugleich dehnte ich diese Versuche auf die anorganischen Nährstoffe aus.

### **I. Vergleich der Zusammensetzung von Mykobakterium lacticola nach Wachstum auf eiweißhaltigem und auf eiweißfreiem Nährboden.**

Die Frage, inwiefern die Zusammensetzung des Bakterienleibes aus organischen Bausteinen gesetzmäßig vorgeschrieben ist und welchen Schwankungen sie unterliegt, läßt sich erst

<sup>1)</sup> S. diese Zeitschrift, Bd. 87, S. 85.

dann vollständig entscheiden, wenn es gelingt, alle Zellbausteine zu isolieren und quantitativ zu bestimmen.

Dies ist aber heute noch nicht ausführbar. Auch ist eine quantitative Bestimmung nur bei einzelnen Proteinbausteinen, vor allem beim Arginin, Histidin und Lysin möglich, und ich habe meine quantitativen Untersuchungen daher nur auf diese Basen ausgedehnt. Bezüglich der Monoamidosäuren habe ich mich mit dem qualitativen Nachweis begnügt.

Bei *Mykobakterium lacticola* zeigte sich eine auffallende Übereinstimmung in den organischen Bestandteilen, mochten sie auf Nährbouillon oder auf eiweißfreiem Nährboden gezüchtet sein. Die anorganischen Elemente dürften größeren quantitativen Schwankungen unterliegen.

Als Stickstoffquelle verwendete ich bei diesen Kulturen das Asparagin und das Ammon (in Form des Lactates). Die Versuche sind mit *Mykobakterium lacticola* ausgeführt worden. Als Nährlösung verwandte ich am Anfang die Fränkelsche Nährlösung, d. i. Kochsalz 5,0, Natriumphosphat 2,0, Ammoniumlactat 6,0, Asparagin 4,0, Glycerin 15,0, Wasser 1000,0. Später benutzte ich nach Proskauer und Beck eine Lösung, welche nur Ammoniumcarbonat als Stickstoffquelle enthielt. Aber das Wachstum der *Mykobakterium lacticola* war dabei zu schlecht, um hinreichendes Material für Untersuchungen zu bekommen. Schließlich habe ich gefunden, daß die Bakterien ziemlich große Mengen von Erdalkalien für ihr Wachstum erfordern. Die Nährlösung für den Hauptversuch hatte folgende Zusammensetzung:

NaCl	5,0
Ka <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0
Ammoniumlactat	4,0
Asparagin	5,0
10% MgSO <sub>4</sub> -Lösung	10,0
Glycerin	15,0
destilliertes Wasser	1000,0.

Die Kulturen setzte ich in mit Wattepfropfen abgeschlossenen Erlenmeyer-Kolben an, nachdem die Nährlösung durch wiederholtes langes Aufkochen zuvor sterilisiert worden war.

Nach 4 tägigem Verweilen im Brutraum von 36,5—37° C. sind die Bakterien zu einem die ganze Oberfläche bedeckenden

zarten Häutchen ausgewachsen und zugleich ist die anfangs farblose Nährlösung durch Farbstoffbildung deutlich hellgelb geworden. Nach 7 Tagen wurden die Häutchen dicker, runzlicher und kletterten an der Glaswand hinauf. Sie erwiesen sich unter dem Mikroskop bedeutend dünner als die auf Peptonbouillon gewachsenen Mykobakterien und auch trat die gekrümmte Gestalt deutlicher hervor. Am 10. Tage wurden die Bakterien auf dem Filter gesammelt, sehr gründlich gewaschen und bei 37° C. getrocknet. Die so getrocknete Bakterienmasse war hellbraun. Der Stickstoffgehalt, welcher nach genauer Wägung mit Hilfe der Kjeldahlschen Methode bestimmt war, betrug in Mykobakterium lacticola aus eiweißfreier Kultur 9,630% N, in Mykobakterium lacticola aus Bouillonkultur 9,636% N.

70 g getrocknete Mykobakterienmasse aus eiweißfreier Kultur wurde in ganz gleicher Weise verarbeitet, wie dies früher mit der Bouillonkultur des Mykobakterium lacticola und des Tuberkelbacillus ausgeführt war.<sup>1)</sup>

Die Resultate waren folgende:

Aus dem Ätherextrakt «I» konnte ich durch Aceton Mykol-ester fällen, dessen Schmelzpunkt 66° C. war. Daneben habe ich diesmal eine geringe Menge eines Phosphatides gefunden, die bei der Bouillonkultur nicht bemerkt wurde. Die Natur dieses Phosphatides war nicht festzustellen, doch lag die Vermutung nahe, daß es sich hier um ein Zersetzungsprodukt des in dem Alkoholextrakt «II» enthaltenen Phosphatids handelt, welches beim Aufbewahren des Materials entstanden war.

Aus dem Alkoholextrakt «II» habe ich die Diaminophosphatide mittels Äther- und Acetonbehandlung isoliert.

Die Analyse gab folgende Resultate:

0,2446 g Substanz nach Neumann verascht, erfordern 12 ccm  $n/2$ -NaOH, d. i. 2,728% P.

0,1056 g Substanz nach Kjeldahl verascht, erfordern 1,8 ccm  $n/10$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> d. i. 2,388% N.

Das Verhältnis P : N beträgt 1 : 1,95.

Die so mit Äther und Alkohol erschöpfte Bakterienmasse, welche eine gelblich weiße Farbe besaß, wurde mit 100 ccm

<sup>1)</sup> Siehe die frühere Mitteilung. Diese Zeitschrift, Bd. 87, S. 84.

Schwefelsäuremischung (2 Teile konzentrierte Schwefelsäure und 1 Teil Wasser) gut angerieben, mit 1 l Wasser verdünnt und filtriert.

In dem Filtrat wurden die Nucleinbasen durch Phosphorwolframsäure von den reduzierenden Substanzen getrennt und Adenin und Hypoxanthin als Pikrate nachgewiesen.

Der rein weiße Rückstand, welcher die Eiweißkörper enthielt, wurde gründlich mit Wasser gewaschen und wieder mit Alkohol und Äther extrahiert. Die so entfettete Substanz wog 41,5 g. Demnach war die Ausbeute an «Eiweiß» von der auf eiweißfreiem Nährboden gezüchteten Kultur des Mykobakterium lacticola größer als von denjenigen aus Bouillonkultur (41 g aus 100 g).

Diese «Eiweißsubstanz» zeigte fast alle Eiweißreaktionen, jedoch war auch in diesem Falle ebenso wie bei den Bouillonkulturen die Schwefelbleireaktion negativ. Der Stickstoffgehalt betrug 8,2%.

Nach der Hydrolyse wurde das Arginin und Histidin in das Pikrolonat und das Lysin in das Pikrat übergeführt.

Die Menge des Argininpikrolonats betrug 2,27 g

Die des Histidinpikrolonats 0,29 »

Das Lysinpikrat wog 0,49 »

Aus dem Monoaminosäurengemisch wurden 1,95 g Phenylalanin durch Krystallisation gewonnen. Das Präparat gab auch in diesem Falle ganz schwache Millonsche Reaktion und schmolz bei  $F = 281^{\circ} C$ .

Zur weiteren Feststellung wurden zwei Stickstoffbestimmungen ausgeführt, davon eine nach Pregl auf mikroanalytischem Wege.<sup>1)</sup>

Die Stickstoffbestimmungen ergaben folgendes Resultat:

1. 0,1308 g Substanz gab 10 ccm N (756 mm,  $25^{\circ} C$ .)

N gefunden = 8,48%.

2. 3,33 mg Substanz gab 0,250 ccm N (759 mm,  $20^{\circ} C$ .)

N gefunden = 8,69% N.

Gefunden:

I. II.

N 8,48% 8,69%

Berechnet:

für  $C_9H_{11}NO_2$

8,48%.

<sup>1)</sup> Ich verdanke die Mikroanalyse der Liebenswürdigkeit des Herrn Dr. Edlbacher, Assistent an dem Physiologischen Institut hier.

1,48 g Prolin wurde durch Alkohol extrahiert und in das Phenylhydantoin geführt. Dasselbe ergab bei N-Bestimmung nach Pregl folgendes Resultat:

1. 3,27 mg Substanz gab 0,367 ccm N (760 mm, 20° C.)

2. 3,35 mg Substanz gab 0,376 ccm N (760 mm, 21° C.)

In beiden Fällen N gefunden = 13,03%.

Gefunden:

I.            II.  
N 13,03%    13,03%

Berechnet:

für  $C_{12}H_{12}N_2O_2$   
12,96%.

Valin wurde durch Methylalkohol extrahiert und wog nach der Reinigung 0,42 g. Die Analyse ergab folgendes:

0,1469 g Substanz gab 0,2762 g  $CO_2$  und 0,1306  $H_2O$ .

Gefunden C = 51,24%, H = 9,94%.

Berechnet für  $C_5H_{11}NO_2$ : C 51,28%, H = 9,40%.

Tabelle I.

	In 40 g Eiweiß des Mykobakt. lacticola		Berechnet in 100 g Eiweiß		Berechnet in 100 g N	
	Bouillon- kultur g	Eiweiß- freie K. g	Bouillon- kultur g	Eiweiß- freie K. g	Bouillon- kultur g	Eiweiß- freie K. g
Gesamter Stickstoff . . .	3,2220	3,206	8,090	8,015	100,0	100,0
A. Basenstickstoff . . .	0,4823	0,4398	1,230	1,100	15,21	13,72
In Arginin . . . . .	0,3780	0,3502	0,946	0,875	11,69	10,92
In Histidin . . . . .	0,0350	0,0350	0,090	0,090	1,11	1,11
Lysin . . . . .	0,0398	0,0371	0,099	0,092	1,23	1,18
Ammoniak . . . . .	0,0295	0,0175	0,074	0,043	0,91	0,54
B. Monoaminosäure-N . .	2,1560	2,040	5,40	5,09	66,74	63,62
In l-Phenylalanin . .	0,1891	0,1651	0,475	0,413	5,89	5,14
l-Prolin . . . . .	0,2466	0,1849	0,620	0,462	7,66	5,76
Valin . . . . .	0,0284	0,0504	0,073	0,126	0,91	1,57
Andere Aminosäuren .	1,6925	1,6396	4,240	4,098	52,34	51,12
C. N in unbekannter Form	0,5837	0,7262	1,464	1,816	18,09	22,66
In Humin . . . . .	0,4680	0,5705	1,175	1,427	14,52	17,80
Im Silberniederschlag .	0,1040	0,1193	0,260	0,2983	3,21	3,72
Im Filtrat des Lysin- pikrates . . . . .	0,01165	0,0364	0,029	0,091	0,36	1,13

Diese Beobachtungen beweisen, daß die Bildung des Mykols, des Phosphatids, der Purinbasen und der Proteinstoffe im Bakterienleibe auch dann erfolgt, wenn Milchsäure, Glycerin und Asparagin als die einzigen organischen Nährstoffe zur Verfügung stehen; die so erzeugten Proteinstoffe unterscheiden sich in keiner Weise von den auf eiweißhaltigem Nährboden gebildeten. Auch unter diesen Umständen, wo die organischen Nährstoffe auf die kurzen und einfachen offenen Kohlenstoffketten beschränkt sind, entsteht das diesem Bakterium eigene, phenylalaninreiche und schwefelfreie Protein. Die Bildung der aromatischen Bausteine des Proteins, die im tierischen Organismus anscheinend nur schwierig vor sich geht, erfolgt hier in ergiebigem Maße.

## II. Die unorganischen Bestandteile von *Mykobakterium lacticola* und von *Bakterium tuberculosis*.

Über die Aschenbestandteile der Tuberkelbakterien liegen nur einige Angaben vor (de Schweinitz und Dorset, Zincke und Krauss und Siebert).

Die Asche soll nach Schweinitz und Dorset<sup>1)</sup> P, Ca, Mg, K, Na und Si, aber kein S und kein Cl in der nach Extraktion mit Alkohol und Äther zurückbleibenden Reste des Tuberkelbacillus enthalten. Nach v. Behring<sup>2)</sup> (von Zincke ausgeführte Aschenanalyse des Bovovaccinbacillus) betrug die Aschenmenge 6,91—7,3% und enthielt viel K, Na, P, Ca und Mg, ferner S und Cl. Krauss und Siebert<sup>3)</sup> machten eine Gegenüberstellung des Aschengehaltes der glycerinfreien Fleischpeptonbouillon und der Tuberkelbacillen und gaben einen sehr hohen Ca-, Mg-, P- und K-Gehalt im Tuberkelbacillenkörper an.

Für meine Bestimmung wurde das trockene Ausgangsmaterial noch 2 Tage im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

<sup>1)</sup> Centr. Bakt., Bd. 23, S. 993.

<sup>2)</sup> Zitiert aus Handbuch d. path. Mikroorg., Kolle-Wassermann, II. Aufl., Bd. 5, S. 431.

<sup>3)</sup> Behringwerk-Mitteilungen, Heft 2, S. 82 u. 83, 1907.

Der Phosphor wurde nach der Neumannschen Methode bestimmt.

Für die Ca-, Mg-, Cl- und S-Bestimmung habe ich das gewogene Material mit Salpeter-Soda-Mischung verascht und die Asche mit verdünnter Salpetersäure gelöst. Die Lösung wurde deutlich ammoniakalkalisch gemacht, dann mit Essigsäure wieder angesäuert. Aus dieser essigsäuren Lösung wurde das Calcium mit Ammoniumoxalat gefällt. Nach einstündigem Stehen auf dem Wasserbad wurde der Niederschlag von Calciumoxalat durch ein aschenfreies Filter filtriert, mit heißem Wasser ausgewaschen, in einem gewogenen Tiegel vorsichtig verbrannt und als Calciumoxyd gewogen.

Das Filtrat der Kalkfällung wurde hinreichend konzentriert und mit Ammoniak stark übersättigt. Nach 12stündigem Stehen filtrierte ich den Niederschlag ab, wusch ihn mit 2,5%iger Ammoniaklösung aus, veraschte ihn und wog ihn als Magnesiumpyrophosphat.

Die Bestimmung des Chlors wurde in dem von Magnesium befreiten Filtrat ausgeführt. Das mäßig abgedampfte und mit Salpetersäure angesäuerte Filtrat wurde durch Silbernitrat gefällt, auf dem Wasserbade erwärmt und filtriert. Das Chlor wurde als Chlorsilber berechnet. Aus dem Filtrat wurde das überschüssige Silber durch Salzsäure entfernt. Dann fügte ich zu der heißen Lösung eine 10%ige Lösung von Baryumchlorid hinzu, filtrierte nach dem Abkühlen und wog den Gesamtschwefel als Baryumsulfat.

Für die Kalium- und Natriumbestimmung habe ich die gewogene Menge der Bakterien nach Neumann verascht und nach der bekannten Methode die Summe des Chlorkaliums und Chlornatriums gewogen. Dann wurde Kalium durch Platinchlorid in alkoholischer Lösung von Natrium getrennt. Aus dem Gewichte des Kaliumplatinchlorids wurde das Gewicht des Kaliumchlorids berechnet und durch Subtraktion derselben von dem vorher gefundenen Gewichte der Summe das Gewicht des Chlornatriums gefunden.

Für die Gesamtaschenbestimmung nahm ich eine kleine Menge von Bakterien und veraschte sie vorsichtig unter sorg-

fältigem Vermeiden von zu starkem Glühen, eventuell unter wiederholtem Ausziehen der schwarzen Kohle mit Wasser, bis eine weiße Asche resultierte.

Die Resultate sind aus der folgenden Tabelle zu ersehen.

Tabelle II. — Aschenbestandteile.

	Prozent in trockener Substanz			Prozent in gesamter Asche		
	Tuberkel- bacillus	Mykobakt. lact. von Bouillon- kultur	Mykobakt. lact. von eiweißfr. Kultur	Tuberkel- bacillus	Mykobakt. lact. von Bouillon- kultur	Mykobakt. lact. von eiweißfr. Kultur
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> . .	4,4920	3,9720	3,4320	46,97	48,29	67,56
CaO . .	0,8216	1,3350	0,0306	8,59	16,24	0,061
MgO . .	0,9386	0,7182	1,0660	9,81	8,73	20,99
Cl . . .	0,1200	0,0821	0,1030	1,25	0,998	2,03
SO <sub>3</sub> . . .	0,0320	1,2450	—	10,79	15,14	—
K <sub>2</sub> O . .	0,7876	0,5063	0,3076	8,23	6,16	6,05
Na <sub>2</sub> O . .	1,0970	0,8008	0,2102	11,48	9,73	4,13
Summe .	9,2888	8,6594	5,1594	—	—	—
Gesamt- asche	9,563	8,223	5,080	100,0	100,0	100,00

Die Angaben verschiedener Untersucher über die anorganischen Bestandteile des Tuberkelbacillus stimmen nur in dem Punkt überein, daß die Asche einen hohen Prozentsatz von Phosphor enthält; aber es zeigen sich sowohl in der gesamten Aschenmenge, wie auch in ihrer Zusammensetzung große Schwankungen. Diese Schwankungen lassen sich zum Teil aus der Verschiedenheit des Nährbodens erklären.

In einer Reihe von Arbeiten war Cramer<sup>1)</sup> bemüht, den Aschengehalt von Choleravibrionen unter verschiedenen Lebensbedingungen festzustellen und für einzelne Aschenbestandteile ergab sich Anreicherung aus dem Substrate, sodaß die Bakterien umsomehr von diesen Stoffen enthielten, je reicher das Substrat daran war. Dasselbe geht auch aus meinen Untersuchungen über die Aschenbestandteile des Myko-

<sup>1)</sup> Archiv für Hygiene, Bd. 28, S. 1.

bacterium lacticola aus Bouillonkultur und aus eiweißfreier Kultur deutlich hervor (siehe Tabelle). Während die Asche des Mykobakterium lacticola aus Bouillonkultur 16,24% CaO und 8,73% MgO enthält, ist in eiweißfreien Kulturen, in denen nur Mg als Sulfat, aber kein Ca gegeben worden war, ein Magnesiumgehalt der Bakterien von mehr als 20% als MgO nachweisbar, CaO dagegen nur spurenweise.

### Zusammenfassung.

1. Bei Mykobakterium lacticola zeigte sich eine auffallende Übereinstimmung in den organischen Bestandteilen, mochten sie auf Nährbouillon oder auf eiweißfreiem Nährboden gezüchtet sein.

2. Aus kurzen und einfachen offenen Kohlenstoffketten erfolgt die Bildung der aromatischen Bausteine im Bakterienkörper in ergiebigem Maße.

3. Die anorganischen Bestandteile der Zellen von Bakterium tuberculosis und von Mykobakterium lacticola können großen quantitativen Schwankungen je nach den Lebensbedingungen unterliegen.

---