

## Zur Chemie der Bakterien.

### III. Mitteilung.

#### Über die chemische Zusammensetzung der Diphtheriebacillen.

Von

**Sakae Tamura** (Tokio).

(Aus dem hygienischen und dem physiologischen Institut der Universität Heidelberg.)

(Der Redaktion zugegangen am 15. Januar 1914.)

Die chemische Zusammensetzung der Bakterien stimmt in ihren Grundzügen mit dem Bau der übrigen Protoplasmen überein, insofern sie die wesentlichen Bausteine der Proteinstoffe, der Nucleinsubstanzen, der Phosphatide, sterinartige Körper und Kohlenhydrate aufweist. Meine erste Mitteilung über die Tuberkelbacillen und über das *Mykobacterium lacticola* läßt dies deutlich erkennen. Doch haben sich bestimmte Eigentümlichkeiten der genannten Bakterien ergeben, welche die Zellsubstanz dieser Organismen auszeichnen. In quantitativer Hinsicht ist das Überwiegen des Phenylalanins unter den Proteinbausteinen bemerkenswert, in qualitativer Beziehung das Fehlen des nicht oxydierten Schwefels in den Proteinen und besonders das Auftreten des Mykols an Stelle der Sterine.

Diese Befunde regen zu der Frage an, bis zu welchem Grade sich die Spezieseigentümlichkeiten und die biologischen Eigenschaften verschiedener Bakterienarten in ihrer chemischen Zusammensetzung ausprägen. Ergibt die chemische Beschaffenheit der Bakterien Anhaltspunkte für ihre Klassifizierung?

Außerdem wurde durch meine Untersuchungen eine spezielle Frage aufgeworfen. Nachdem ich das Mykol als Ursache der Säurefestigkeit der vorhin genannten Bakterien erkannt hatte, schien es mir wichtig, eine andere Bakterienart, welche die Säurefestigkeit nicht zeigt, auf das Vorhandensein von Mykol

zu untersuchen. Ich wählte dazu die Diphtheriebacillen, welche sich morphologisch und biologisch von den Tuberkelbacillen und dem *Mykobacterium lacticola* erheblich unterscheiden.

### Material.

Zunächst mußte ich versuchen, einen Nährboden ausfindig zu machen, welcher die Gewinnung hinreichender Materialmengen und die leichte Trennung der Bakterienmasse von dem Wachstumsmedium gestattet. Bekanntlich gedeihen Diphtheriebacillen besonders gut auf einer Fleischbrühe, die statt des sonst gebräuchlichen Witteschen Peptons 2% Chapoteau-Pepton enthält. Indes zeigte das Häutchen, das der Bacillus auf dieser Bouillon bildet, bei längerem Aufenthalt im Brutschrank eine Neigung zum Sinken, welche die Trennung der Bakterien von ihrer Nährflüssigkeit bedeutend erschwert.

Um große Mengen von reinen Diphtheriebacillen leicht zu bekommen, bewährte sich mir folgendes Verfahren: 500 g klein gehackte Hammelnieren werden mit 1000 ccm Wasser gekocht und in gleicher Weise wie bei der Fleischwasserbereitung behandelt. Diesem Hammelnierenextrakt werden 20 g Pepton-Chapoteau und 5 g Kochsalz hinzugesetzt und die Mischung im Kolben in den Dampfstopf bis zur Lösung gestellt, dann wird sie mit Natron vorsichtig alkalisch gemacht (Indikator: Lackmus), alsdann wird filtriert und sterilisiert.

Diese Hammelnierenbouillon mit Zusatz von Pepton-Chapoteau wird in nicht zu hoher Schicht in Erlenmeyer-Kolben gefüllt (etwa 100 ccm in 300 ccm fassende Kolben, bei solchen mit größerer Bodenfläche entsprechend mehr) und nach Sterilisation mit frischer Diphtheriebacillenkultur so geimpft, daß die Bacillenmasse sich auf der Oberfläche schwimmend erhält.

Auf diesem Nährboden vermehren sich die Diphtheriebacillen sehr kräftig und bilden nach 24 stündiger Bebrütung bei 36° C. ein dickes, glattes Häutchen, welches 2—3 mm hoch an der Glaswand hinaufklettert. Die Häutchen sind im allgemeinen glatt, brüchig, von weißgelblicher Farbe und ohne eigentliche Farbstoffbildung. Allmählich nimmt der Belag an Dicke zu, hat aber keine Neigung, zu Boden zu sinken, wenn

man den Kolben ruhig stehen läßt. Nach 24 Stunden wurde eine Ammoniakentwicklung wahrgenommen, die so stark war, daß der ganze Brütoven mit einem eigentümlichen, an Harnzersetzung erinnernden Geruch angefüllt wurde. Das Innengas des Kolbens reagierte deutlich alkalisch gegen Lackmuspapier und bräunte gelbes Curcumapapier. Die Bacillen sind kurze, dicke Stäbchen und haben alle morphologischen Merkmale der Diphtheriebacillen.

Nach fünftägiger Kultivierung wurden die Kölbchen vorsichtig dekantiert, sodaß die Schwimmhäutchen an der Glaswand angehaftet blieben und nur die untenstehende klare Bouillon entfernt wurde. Die in den Kölbchen zurückgebliebenen Bakterien wurden mit Wasser auf Filtrierpapier gesammelt und gründlich ausgewaschen, bis das Filtrat vom Nährmedium ganz befreit war. Die so gesammelte Bakterienmasse war matt gelbweiß und wurde im Trockenschrank unter allmählicher Steigerung der Temperatur auf 90° C. eine Viertelstunde erhitzt und darauf bei 37° C. ganz getrocknet. Der so getrocknete Diphtheriebacillus sah ganz braun aus und ließ sich leicht pulverisieren.

Mit dieser Methode habe ich über 50 g Diphtheriebacillen in getrocknetem Zustande erhalten. Dieses Material hat 9,75% Stickstoff.

### Lipoidstoffe.

In den Tuberkelbacillen und *Mykobacterium lacticola* hatte ich in allen Fraktionen der lipoiden Stoffe keine Substanz, die Cholesterinreaktion zeigte, gefunden. Statt dessen erschien ein hochmolekularer Alkohol, der alle charakteristischen Färbungsreaktionen der Bakterienkörper aufwies, das «Mykol». <sup>1)</sup> In den Diphtheriebacillen ist die Menge der lipoiden Stoffe nicht so groß wie in den Tuberkelbacillen und es war deshalb sehr schwierig, an ihnen eine eingehendere chemische Untersuchung der Lipoide auszuführen. Immerhin konnte ich feststellen, daß in allen Fraktionen der lipoiden Stoffe von Diphtheriebacillen ebenso wie bei den früher von mir untersuchten Bakterienarten keine Cholesterinreaktionen zu erhalten sind.

<sup>1)</sup> Siehe diese Zeitschrift, Bd. 87, S. 93.

Die Untersuchung der lipoiden Stoffe wurde in ganz gleicher Weise wie bei dem Tuberkelbacillus vorgenommen: 45 g der im Vakuum über Schwefelsäure getrockneten Diphtheriebacillen wurden zuerst mit Äther (I) und dann mit Alkohol (II) extrahiert.

Das ätherische Extrakt (I) war hellgelb, es wurde auf ein kleines Volumen eingedampft und mit Aceton gefällt. Der Niederschlag (Ia) bildete eine weiße zusammengeballte Masse, welche phosphorhaltig war. Zur weiteren Reinigung wurde der Niederschlag in Äther gelöst und mit Alkohol gefällt. Es entstand ein weißer, flockiger Niederschlag, nach 3—4 maliger Reinigung wurde er aus heißem Alkohol umkrystallisiert; so bekam ich ganz weiße wachsartige Massen, die bei 180° C. schmolzen und keinen Phosphor enthielten. Diese wachsartige Substanz erwies sich bei Färbungsversuchen als grampositiv, aber nicht säurefest (siehe unten).

Die phosphorhaltige Substanz, die aus ätherischer Lösung durch Aceton gefällt, aber durch Alkohol nicht gefällt wurde, wog 0,005 g und wurde nicht weiter untersucht.

Das alkoholische Extrakt (II), welches Phosphatide enthielt, wurde im Vakuum abgedampft und der Rückstand mit Äther extrahiert. Die ätherische Lösung wurde nach hinreichender Konzentration mit Aceton versetzt, so lange noch Fällung eintrat. Diese Operation, die aus Acetonfällung und Ätherlösung besteht, wurde dreimal wiederholt, dann löste sich der Acetonrückstand klar in Äther. Schließlich wurde diese Substanz einmal in Alkohol gelöst. Auf diese Weise erhielt ich eine gelbbraune klebrige Masse, die in Äther und Alkohol glatt löslich war. Die so von Fett befreite Substanz wog 0,31 g. Die Analyse dieser Substanz führte zu folgenden Ergebnissen:

0,1390 g Substanz, nach Neumann auf Phosphor untersucht,  
verbrauchen 9,8 ccm  $\frac{n}{2}$ -Natronlauge, d. i. 3,9% P.

0,1220 g Substanz, nach Kjeldahl auf Stickstoff untersucht,  
verbrauchen 1,4 ccm  $\frac{n}{10}$ -Schwefelsäure, d. i. 1,6% N.

Das Verhältnis P : N beträgt 1 : 0,91. Hiernach ist kein Zweifel, daß die Hauptmenge der Substanz aus Diphtherie-

bacillen nicht die gleiche ist, wie aus Tuberkelbacillen und *Mykobact. lact.*; die sich als Diaminomonophosphatid erwies. Man kann vielmehr aus den Analysen schließen, daß hier ein Monoamino-monophosphatid, wie Lecithin, vorliegt.

### Proteinstoffe.

Die in oben beschriebener Weise entfetteten und getrockneten Diphtheriebacillen, deren Menge 40 g betrug, wurden nun mit einer Mischung von zwei Teilen konzentrierter Schwefelsäure und einem Teil Wasser zerrieben und dann mit Wasser verdünnt, bis der Schwefelsäuregehalt ungefähr 5% betrug. Der bei der Verdünnung mit Wasser entstandene flockige Niederschlag war gelbweiß und amorph. Die Zerstörung des Bacillenleibes wurde dadurch so vollständig bewirkt, daß man unter dem Mikroskop keine unveränderten Bakterien mehr sehen konnte. Die Flüssigkeit (A) wurde von diesem Niederschlag (B) abfiltriert. Die weitere Verarbeitung des Niederschlags siehe unten.

Das Filtrat (A) war klar, gelblich und reduzierte Kupferlösung bei alkalischer Reaktion. Es zeigte keine auf Eiweiß hinweisende Farbenreaktion. Um die reduzierende Substanz abzutrennen, wurde das Filtrat mit Phosphorwolframsäure gefällt und vom Niederschlag abfiltriert. Dieses neue Filtrat (C) wurde weiter für die Untersuchung der reduzierenden Substanzen aufbewahrt. (Siehe IV. Mitteilung.)

Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde mit 5%iger Schwefelsäure ausgewaschen, dann mit überschüssigem Baryt zersetzt und filtriert. Das Filtrat wurde nach Entfernen des überschüssigen Baryts durch Kohlensäure eingedampft. Diese konzentrierte Lösung zeigte die gleichen Reaktionen der Nucleinbasen wie bei Tuberkelbacillen und *Mykobact. lact.*<sup>1)</sup> Sie wurde mit Pikrinsäure versetzt, aber in diesem Falle war die Menge des Pikrates zu gering, um eine Analyse auszuführen. Nach der Schmelzpunktbestimmung und der mikroskopischen Untersuchung ist Adeninpikrat anzunehmen.

<sup>1)</sup> Siehe I. Mitteilung: Diese Zeitschrift, Bd. 87, S. 100.

Der durch Wasser gefällte Niederschlag (B) wurde mehrmals mit Wasser gewaschen, bis die Reaktion des Waschwassers nicht mehr sauer war. Bei der wiederholten Waschung muß man dem Waschwasser etwas Alkohol hinzufügen, besonders wenn die Reaktion fast neutral ist, sonst geht ein Teil des Eiweißes, das in Wasser löslich ist, verloren. Der gründlich gewaschene Niederschlag wurde nochmals einer ausgiebigen Extraktion mit Alkohol und Äther unterworfen. Die aus 40 g entfetteter Diphtheriebacillen erhaltene Menge des Niederschlags B betrug 26,5 g. Diese Masse bestand im wesentlichen aus Eiweiß, enthielt keine reduzierende Substanz mehr und zeigte fast alle bekannten Eiweißreaktionen (Biuretreaktion, Xanthoproteinreaktion, Millonsche Reaktion, Tryptophanreaktion); nur die Schwefelbleireaktion war negativ. Also bezüglich der Farbenreaktionen stimmt sie mit der Eiweißmasse aus Tuberkelbacillen und *Mykobact. lact.* gut überein. Sie enthielt 12,99% Stickstoff (bei Tuberkelbacillen 9,2%; bei *Mykobact. lact.* 8,2%) und war teilweise löslich in Wasser, verdünnter Kochsalzlösung, verdünnten Alkalien und konzentrierter Schwefelsäure.

Wenn auch die Löslichkeitsverhältnisse kein wissenschaftliches Einteilungsprinzip der Eiweißkörper darstellen, so ergibt sich aus ihnen doch in unserem Falle, daß die Proteinstoffe der Diphtheriebacillen einen anderen chemischen Charakter als die der Tuberkelbacillen und des *Mykobact. lact.* haben.

Zur Gewißheit wird diese Vorstellung auf Grund der quantitativen Ergebnisse der Eiweißspaltung. Wenn es allerdings auch in keinem Falle gelungen ist, auch nur annähernd die Menge aller Spaltungsprodukte festzustellen, so zeigen doch die bisher festgestellten Abbauprodukte des Diphtheriebacillenproteins im Gegensatz zu dem Tuberkelbacilleneiweiß zum mindesten bedeutende quantitative Unterschiede.

Ich führte die Hydrolyse dieser Eiweißmasse aus Diphtheriebacillen aus, indem ich 25 g Substanz mit 25%iger Schwefelsäure am Rückflußkühler 14 Stunden lang erhitzte. Das braunschwarze Reaktionsprodukt zeigte keine Biuretreaktion mehr. Die ausgeschiedene dunkle Masse, welche größtenteils aus fett-

säureähnlichen Stoffen bestand, wurde nach dem Erkalten abfiltriert; ihre Menge betrug 1,2 g, also 4,8% der angewandten Eiweißmasse. Dieselbe wurde mit Äther extrahiert. Die nach Verdunsten des Äthers hinterbliebene braune Masse wurde in siedendem Alkohol gelöst. Aus der Lösung schied sich beim Abkühlen ein geringer flockiger Niederschlag aus. Die Menge war zu gering für weitere Untersuchungen, aber nach dem Verhalten zu Farbstoffen kann man sagen, daß es kein Mykol ist. Filtrat und Waschwasser wurden vereinigt und nach dem Verfahren von Kossel und Kutscher ganz ebenso wie bei Tuberkelbacilleneiweiß verarbeitet.

Die hellgelbe von Huminstoff und Ammoniak befreite Flüssigkeit wurde bei Gegenwart von Schwefelsäure mit Phosphorwolframsäure gefällt.

**Diaminosäurefraktion:** Aus dem mittels Phosphorwolframsäure abgeschiedenen Niederschlag werden mit Hilfe des bekannten Verfahrens Arginin und Histidin in das Pikrolonat, das Lysin in das Pikrat übergeführt. Alle diese Substanzen wurden durch den Schmelzpunkt identifiziert.

Die Menge des Argininpikrolonats betrug	2,45 g
» » » Histidinpikrolonats	0,327 »
Lysinpikrat wog	2,12 »

Um die Verschiedenheit der einzelnen Eiweißkörper aufzuklären, hat man sich mehrfach bemüht, einzelne besser isolierbare Spaltungsprodukte, so die Diaminosäuren, quantitativ zu bestimmen. Die nachstehende Tabelle gibt eine Übersicht dieser Eiweißbasen in den Diphtheriebacillen.

Tabelle I.

	In 25 g Eiweiß des Diphtheriebacillus g	% in Eiweiß
Arginin . . . . .	1,065	4,25
Histidin . . . . .	0,1212	0,485
Lysin . . . . .	0,838	3,34

**Monoaminosäurefraktion.** Sie wurde durch Baryt von Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure befreit und abgedampft; der gesamte Stickstoff in der Lösung betrug 1,783 g.

**Tyrosin:** Um das schwer lösliche Tyrosin ganz zu gewinnen, wurde die Lösung verdampft, bis schon in der Wärme eine reichliche Krystallisation eintrat. Nach dem Erkalten wurde filtriert und die Krystallmasse, welche ungefähr 2 g betrug, mit wenig Wasser ausgewaschen. Den Rückstand löste ich dann in 100 ccm siedendem Wasser, kochte ihn mit Tierkohle, dampfte das klare Filtrat bis auf 50 ccm ein und ließ es in der Kälte stehen. Die Ausbeute an ziemlich reinen Tyrosin-krystallen betrug 0,6 g. Die Mutterlauge von Tyrosin wurde weiter abgedampft und für die Leucin- und Isoleucinuntersuchung aufbewahrt.

Das nochmals aus heißem Wasser umkrystallisierte Tyrosinpräparat schmolz bei 293° (unkorr.) und gab folgende Zahlen:

3,16 mg Substanz: 0,206 ccm N<sup>1)</sup> (11°, 767 mm).

$C_9H_{11}NO_2$ . Ber. N: 7,74%, gef. N: 7,91%.

**Leucin:** Als die Mutterlauge der Tyrosin-krystalle weiter bis auf 20 ccm abgedampft wurde, schieden sich reichlich weiße Krystalle aus, die bei mikroskopischer Untersuchung aus charakteristischen «Leucinkugeln» und nadelförmigen Krystallen bestanden. Die ganze Masse betrug 1,2 g. Um das Leucin möglichst von dieser Mischung zu trennen, habe ich die ganze Masse in 500 ccm Wasser gelöst, eine Stunde mit überschüssigem, frisch gefälltem Kupferoxydhydrat gekocht, abfiltriert, den Rückstand wiederholt mit Wasser ausgekocht, bis das Filtrat nicht mehr gefärbt war und die vereinigten Filtrate (zusammen 800 ccm) bei Zimmertemperatur über Nacht stehen lassen. Die ausgeschiedenen hellblauen Krystallschuppen wurden mit 50 ccm Wasser ausgekocht. Es verblieb ein Rest von 0,25 g schwer löslichem Kupfersalz, das hauptsächlich aus der Leucinverbindung bestand. Ein Teil desselben, der mit siedendem Wasser umkrystallisiert wurde, ergab nach dem Trocknen den folgenden Stickstoffgehalt:

3,63 mg Substanz: 0,25 ccm N (10,5°, 767 mm).

$(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$ . Ber. N: 8,67%, gef. N: 8,39%.

<sup>1)</sup> Die Elementaranalysen wurden in allen Fällen nach Pregl ausgeführt.



Ein anderer Teil des Kupfersalzes des Leucins wurde mit Schwefelsäure gelöst und mit Schwefelwasserstoff das Kupfer entfernt. Das klare Filtrat von  $\text{CuS}$  wurde mit Baryt neutralisiert. Die freie Aminosäure wurde mit Alkohol gefällt. Die so erhaltenen Leucinkugeln erschienen aus deutlich radial gruppierten, sehr dünnen Blättchen zusammengesetzt und schmolzen in geschlossenen Röhrchen bei  $275^\circ \text{C}$ . (unkorr.).

Die Analyse ergab folgende Zahlen:

3,07 mg Substanz: 0,270 ccm N ( $11.5^\circ$ , 761 mm).

$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_4\text{N}$ . Ber. N: 10,69%, gef. N: 10,59%.

Also kann es kein Zweifel sein, daß der aus dem Diphtheriebacilleneiweiß in dieser Weise erhaltene Körper mit dem gewöhnlichen Leucin identisch ist. Seine in dieser Weise gefundene Menge ist aber viel geringer als die tatsächlich in der Eiweißmenge vorhandene.

Isoleucin: Die vom Leucinkupfer abfiltrierte hellblaue Lösung wurde bis zur Trockene abgedampft und der getrocknete tiefblaue Rückstand mit Methylalkohol extrahiert. Das in Methylalkohol lösliche Kupfersalz wurde abgedampft und wieder in Methylalkohol gelöst. Dieses Verfahren habe ich dreimal wiederholt; auf diese Weise habe ich 0,3 g eines blau violetten Kupfersalzes, das vollkommen in kaltem Methylalkohol löslich war, erhalten.

Die Analysen ergaben folgende Zahlen:

4,19 mg Substanz: 0,294 ccm N ( $11^\circ$ , 759 mm).

3,610 „ „ : 5,920 mg  $\text{CO}_2$ , 2,26 mg  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,885 mg  $\text{CuO}$ .

$(\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2)_2\text{Cu}$ . Ber.: C 44,47%, H 7,47%, Cu 19,63%, N 8,67%.

Gef.: C 44,72%, H 7,01%, Cu 19,59%, N 8,42%.

Die Formel stimmt also mit der der Leucine überein und die Löslichkeit weist auf das Isoleucin hin.

Der in Methylalkohol unlösliche Rückstand bestand aus blauen Krystallen, welche in Wasser leicht löslich waren, und wurde nicht weiter untersucht.

Prolin: Die vom rohen Tyrosin abfiltrierte braungelbe Flüssigkeit wurde bis zur Trockene abgedampft und dreimal mit absolutem Äthylalkohol ausgekocht. Die nach dem Verdunsten der alkoholischen Lösung zurückbleibende Aminosäure wurde zur Reinigung wieder mit Äthylalkohol aufgenommen.

Der von unlöslichen Substanzen abgetrennte Alkohol wurde nochmals abgedampft und der Rückstand mit überschüssigem Kupferoxydhydrat gekocht. Die tiefblaue Lösung wurde auf dem Wasserbade abgedampft, wobei ein blaugrünes Kupfersalz ausschied. Sein Gewicht betrug gegen 1 g. Dieses Kupfersalz wurde mit absolutem Äthylalkohol gelöst und vom geringen unlöslichen Salz befreit.

Dieses in Äthylalkohol lösliche Kupfersalz wurde durch Zusatz von Äther als flockiger, hellblauer Niederschlag gefällt und abgesaugt. Das im Vakuumexsikkator getrocknete Salz war grün gefärbt und wog 0,84 g.

Es ergab folgende Zahlen:

5,64 mg Substanz: 0,450 ccm N (11,5°, 761 mm).

$C_{10}H_{10}O_4N_2Cu$ . Ber. N: 9,63%, gef. N: 9,58%.

Es ist somit l-Prolinkupfersalz.

Dann wurde das freie Prolin mit Schwefelwasserstoff aus seinem Kupfersalz dargestellt und in der bekannten Weise die Phenylisocyanatverbindung sowie deren Hydantoin gewonnen. Das Hydantoin zeigte den Schmelzpunkt 143° C., was auch der l-Prolinverbindung entspricht.

Die Analyse des Hydantoins ergab folgendes:

3,19 mg Substanz: 0,343 ccm N (11,5°, 764 mm).

$C_{12}H_{12}N_2O_2$ . Ber. N: 12,96%, gef. N: 12,97%.

Aus dem in Alkohol unlöslichen Kupfersalz wurden folgende Zahlen gefunden:

6,24 mg Substanz: 0,510 ccm N (12°, 765 mm).

$C_{10}H_{16}O_4N_2Cu$ . Ber. N: 9,63%, gef. N: 9,84%.

Die Menge war zu wenig, um daraus die freie Aminosäure zu erhalten. Diese Substanz ist aber wahrscheinlich r-Prolin.

Valin: Der in Äthylalkohol unlösliche Teil wurde mit Methylalkohol extrahiert, aus dieser Lösung schied sich beim Eindampfen eine Monoaminosäure aus, deren Gewicht 0,8 g betrug und deren Kupfersalz größtenteils in Methylalkohol löslich und schön blauviolett war.

Dieses in Methylalkohol lösliche Kupfersalz wurde bei 100° C. getrocknet, wieder im kalten Methylalkohol gelöst, von dem unlöslichen Rückstand abfiltriert und abgedampft. Das

auf diese Weise wiederholt gereinigtes Kupfersalz, das leicht in kaltem Methylalkohol löslich war, ergab folgende Zahlen:

3,45 mg Substanz: 0,265 ccm N ( $12^{\circ}$ , 763 mm).

3,705 „ „ 5,40 mg  $\text{CO}_2$ , 2,32 mg  $\text{H}_2\text{O}$ , 1,04 mg  $\text{CuO}$ .

$(\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}_2)_2\text{Cu}$ . Ber.: C 40,58%, H 6,81%, Cu 21,48%, N 9,48%.

Gef.: C 39,75%, H 7,00%, Cu 22,43%, N 9,24%.

Also stimmen die Analysen mit dem erwarteten Valinsalz nicht gut überein. Zur Erzielung eines reineren Präparates wurde daher das ganze Kupfersalz in Methylalkohol gelöst und mit Hilfe von Schwefelwasserstoff die freie Aminosäure regeneriert.

Die freie Aminosäure wurde in bekannter Weise zuerst in die Phenylisocyanatverbindung und diese in das Hydantoin übergeführt. Letzteres schied sich ölig aus. Die ölige Masse wurde mit 100 ccm Äther ausgeschüttelt, die ätherische Lösung wurde abgedampft, der Rückstand nochmals in heißem Wasser gelöst und in der Kälte stehen gelassen. Dann erschien das Hydantoin teils in Krystallen, teils noch in öliger Beschaffenheit. Zur Entfernung des Öls habe ich das darüberstehende Wasser abgossen und den Rückstand mit wenigem Alkohol vorsichtig abgespült. Die ölige Masse löste sich spielend in Alkohol, während die krystallinischen Ausscheidungen ungelöst zurückblieben.

Diese farblosen kugelig gruppierten Nadelkrystalle schmolzen bei  $125^{\circ}$  C. (unkorr.) und ergaben folgende Zahlen:

2,90 mg Substanz: 0,311 ccm N ( $15^{\circ}$ , 759 mm).

$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ . Ber. N: 12,84%, gef. N: 12,70%.

Diese stimmen somit in ihrem Stickstoffgehalt mit dem Valin-Hydantoin überein.

Die ölige Masse wurde noch nicht weiter untersucht.

Einen orientierenden Überblick über die im Eiweiß enthaltenen Gruppen ermöglicht die nachstehende Tabelle, welche die oben erhaltenen Resultate der Spaltung des Diphtheriebazilleneiweißes enthält. (Tabelle II.)

### Färbungsverfahren.

Das Gramsche Verfahren hat für die Differentialdiagnostik der pathogenen Mikroorganismen eine weitgehende Bedeutung

Tabelle II.

	In 25 g Eiweiß g	Berechnet in 100 g Eiweiß g	Berechnet in 100 g N %
Gesamtstickstoff . . . . .	3,2647	12,9588	100,00
A. Basenstickstoff . . . . .	0,5511	2,2044	16,89
in Arginin . . . . .	0,3475	1,3900	10,64
Histidin . . . . .	0,0336	0,1344	1,03
Lysin . . . . .	0,1612	0,6448	4,93
Ammoniak . . . . .	0,0088	0,0352	0,27
B. Monoaminosäure-N . . . . .	1,7830	7,1320	54,62
in Tyrosin . . . . .	0,0464	0,1856	1,42
Leucin . . . . .	0,0228	0,0912	0,70
Isoleucin . . . . .	0,0260	0,1040	0,79
Prolin . . . . .	0,0960	0,3840	2,94
Valin . . . . .	0,0955	0,3820	2,92
andere Aminosäuren . . . . .	1,4963	5,9852	45,82
C. N in unbekannter Form . . . . .	0,9306	3,7224	28,51
in Humin . . . . .	0,8080	3,2320	24,75
Silberniederschlag . . . . .	0,0282	0,1128	0,86
Filtrat des Lysin pikrates . . . . .	0,0944	0,3776	2,89

erlangt, weil eine Reihe von Bakterienarten bei der Behandlung nach dieser Methode sich stets gefärbt und eine Reihe sich stets ungefärbt zeigt. Die Diphtheriebacillen färben sich gewöhnlich nach dieser Methode gut. Nach der Ansicht von Czaplewski<sup>1)</sup> soll die Gramsche Reaktion an aus älteren Kulturen stammenden Bakterien schlecht oder gar nicht eintreten, jedoch blieb meine 5tägige Kultur der Diphtheriebacillen auf Hammelnierenbouillon mit Pepton-Chapoteau durch die Behandlung nach dem ursprünglichen Gramschen Verfahren gut gefärbt, wurde aber durch den Salzsäurealkohol nach Günther vollständig entfärbt.

Die mit Äther und Alkohol extrahierten Diphtheriebacillen waren nach dem Gramschen Verfahren schlecht färbbar; sie gaben bei der Behandlung mit absolutem Alkohol den Farb-

<sup>1)</sup> Hyg. Rundschau, 1896.

stoff leichter ab, als die nicht entfetteten. Ähnliche Feststellungen hat Fritz Reichert<sup>1)</sup> auch an anderen Bakterien gemacht.

Tabelle III.

Deckglaspräparat nach Gram gefärbt.

Diphtheriebacillen		Entfettete Diphtheriebacillen	
Differenzierung in absolutem Alkohol	Nachfärbung mit verdünnter Carbolfuchsin- lösung	Differenzierung in absolutem Alkohol	Nachfärbung mit verdünnter Carbolfuchsin- lösung
nach 3 Min. schwarzblau	schwarzblau	nach 3 Min. blaßblau	violett
5	blauviolett	5	violettrot
8           blau		8	

Die Nachfärbungen wurden nach den Differenzierungen in absolutem Alkohol ausgeführt.

Aus dem ätherischen Extrakt (I) habe ich, wie oben erwähnt (S. 292), einen weißflockigen Niederschlag mit Alkohol gefällt. Diese in Alkohol schwer löslichen lipoiden Stoffe wurden auf dem Deckglas aufgestrichen und mit Anilinwassergentiana-violett gefärbt. Sie nahmen sehr gut den Farbstoff an und färbten sich violett. Wenn man auf dieses violett gefärbte Präparat eine Jodjodkalilösung wirken ließ, so veränderte sich die Farbe in blauschwarz. Diese für die grampositiven Bakterien charakteristische Änderung des Farbtons blieb bei der Behandlung mit absolutem Alkohol bestehen.

Das alkoholische Extrakt (II) enthält ebenfalls nach Gram färbbare lipoiden Stoffe. Die in heißem Alkohol gelösten und in der Kälte gefällten lipoiden Stoffe waren ganz weiß und ebenso gut färbbar wie die aus dem ätherischen Extrakt erhaltenen.

Beide aus ätherischem und alkoholischem Extrakt erhaltenen lipoiden Stoffe waren leicht löslich in Äther, Petroläther, Chloroform und Xylol, schwer löslich in Aceton und kaltem Alkohol. Diese lipoiden Stoffe waren mit wässriger Methylenblaulösung weder in der Wärme noch in der Kälte färbbar, nahmen aber mit alkalischem Methylenblau (Löffler-

<sup>1)</sup> Fritz Reichert. Beiträge zur Gram-Färbung, Dissertation Heidelberg, 1913.

schem Methylenblau) sofort eine blaue Farbe an. Wenn man diese lipoiden Stoffe mit Carbofuchsin behandelte, so färbten sie sich schön rot, wurden jedoch in Alkohol oder 3%igem HCl-Alkohol sofort farblos. Deshalb sind diese färbbaren lipoiden Stoffe nicht identisch mit Mykol, dem färbbaren höheren Alkohol in säurefesten Bakterien.

Über ihre chemische Natur weiß man heute noch nichts, jedoch kann man aus obigem Ergebnis schließen, daß die Färbbarkeit der Diphtheriebacillen zu dieser Lipoidsubstanz in inniger Beziehung steht.

### Zusammenfassung.

Zum Schluß mögen einige der wichtigsten Ergebnisse dieser Untersuchungen noch einmal hervorgehoben werden:

Durch Alkoholextraktion wurde in Diphtheriebacillen ein Monoaminomonophosphatid gefunden.

Das Vorhandensein von Adenin in Diphtheriebacillen ist sehr wahrscheinlich.

Unter den Eiweißbausteinen wurden die folgenden Aminosäuren gefunden: Arginin, Histidin, Lysin, Tyrosin, Leucin, Isoleucin, r- und l-Prolin, Valin und durch Reaktion Tryptophan. Dagegen tritt keine Schwefelbleireaktion ein.

Die quantitativen Verhältnisse dieser Aminosäuren in den Diphtheriebacillen sind aus den Tabellen (I und II) zu ersehen.

Die Proteine der Diphtheriebacillen unterscheiden sich in ihren Löslichkeitsverhältnissen von den aus Tuberkelbacillen und Mykobacterium lacticola gewonnenen.

Die mit Äther und Alkohol extrahierten Diphtheriebacillen sind nach dem Gramschen Verfahren mit absolutem Alkohol leichter zu entfärben, wie die nicht entfetteten.

Aus dem ätherischen und alkoholischen Extrakt wurde eine lipoide Substanz gewonnen, welche nach Gram charakteristisch färbbar ist.

Gegenüber den früher von mir untersuchten Tuberkelbacillen und dem Mykobacterium lacticola wurden bisher folgende Unterschiede gefunden:

Mykol war beim Diphtheriebacillus nicht nachweisbar.

Unter den Phosphatiden wurde beim Diphtheriebacillus ein Monoamidomonophosphatid, bei den beiden vorhingenannten Bakterien ein Diaminomonophosphatid nachgewiesen.

Die Löslichkeitsverhältnisse der Proteine sind verschieden.

Die Proteine der Tuberkelbacillen und des Mykobacterium lacticola sind reich an Phenylalanin, im Protein der Diphtheriebacillen ist entweder überhaupt kein Phenylalanin vorhanden oder die Menge dieses Bausteins ist bedeutend geringer, hingegen überwiegt in den Diphtheriebacillen die Menge des Tyrosins.

Eine Übereinstimmung ergibt sich in bezug auf das Fehlen des unoxydierten Schwefels unter den Proteinbausteinen und in der äußerst geringen Menge des Ammoniaks, welche bei der Hydrolyse der Proteine frei wird.

Die Gram-Färbung scheint bei allen drei untersuchten Spezies auf der Gegenwart lipoider Stoffe zu beruhen.