

Experimentelle Studien über den Nucleinstoffwechsel.

5. Mitteilung.

Über die Aufspaltung des Purinringes durch Bakterien der menschlichen Darmflora.

Von

S. J. Thannhauser und G. Dorf Müller.

(Aus der II. Med. Klinik München, F. Müller.)

(Der Redaktion zugegangen am 15. April 1918.)

In früheren Mitteilungen¹⁾ haben wir gezeigt, daß durch den menschlichen Dünndarmsaft der Polynucleotidkomplex der Hefenucleinsäure in Triphosphonucleinsäure und Uridinphosphorsäure aufgespalten wird. Die Triphosphonucleinsäure ist ein Trinucleotid, das sich aus den Nucleotiden der Guanosin-Adenosin-Cytidinphosphorsäure aufbaut. Die Uridinphosphorsäure ist das Mononucleotid des Uracils. Beide Körper sind in Wasser leicht löslich. Durch den Darmsaft wird somit das schwer wasserlösliche Polynucleotid jedenfalls durch hydrolytische Auflösung der Phosphorsäureanhydridbindungen des Polynucleotidmoleküles in leicht wasserlösliche, einfachere Nucleotidkomplexe aufgespalten. Es ist ungeklärt, ob dieser hydrolytische Vorgang eine Funktion eines der bereits bekannten Darm- oder Pankreasfermente ist oder ob er einem spezifischen Fermente, einer «Nucleotidacidase», zuzuschreiben ist. Ein nucleolytisches Ferment, eine Nuclease, die das Polynucleotidmolekül in kleine Spaltstücke aufspaltet, konnte bei unseren Versuchen nicht beobachtet werden, da es uns niemals gelang, freie Purine in der Verdauungsflüssigkeit nachzuweisen. Die große Wasserlöslichkeit der von uns aus der

¹⁾ S. J. Thannhauser, Diese Zeitschr., Bd. 91, S. 329 (1914); S. J. Thannhauser und G. Dorf Müller, Diese Zeitschr., Bd. 100, S. 121 (1917).

Verdauungsflüssigkeit isolierten Nucleotidkomplexe der Triphosphonucleinsäure und der Uridinphosphorsäure läßt es wahrscheinlich erscheinen, daß diese Spaltstücke zur Resorption gelangen. Über den weiteren Abbau des Purinanteiles der Nucleotide im intermediären Stoffwechsel gaben uns die subcutanen Injektionen der Nucleoside Adenosin und Guanosin¹⁾ Aufschluß. Die in den Purinzuckerverbindungen vorgebildeten Aminopurine werden zu 80 bis 100% als Harnsäure ausgeschieden. Die Unzerstörbarkeit der Harnsäure im intermediären Stoffwechsel wurde lange vor den Nucleosidinjektionen von Löwi,²⁾ Soetbeer und Ibrahim,³⁾ besonders von Wiechowski⁴⁾ und auch von Umber⁵⁾ angenommen. Diese Forscher führten parenteral Harnsäure teils subcutan teils intravenös zu und fanden die injizierten Harnsäuremengen quantitativ im Harn wieder. Gegen diese Versuche führte man an, daß die Harnsäure, wenn sie einmal im intermediären Stoffwechsel gebildet ist, wohl nicht mehr weiter abgebaut werden könne, daß aber eine Aufspaltung des Purinringes vor der Harnsäurebildung bei den Vorstufen der Harnsäure sehr wohl möglich wäre. Dieser Einwand ist nunmehr durch die Resultate der Nucleosidinjektionen entkräftet und die Harnsäure als das Stoffwechselendprodukt des intermediären Purinstoffwechsels anzusehen. Die im Darm zu wasserlöslichen Komplexen aufgespaltenen Polynucleotide werden, soweit sie als einfach zusammengesetzte Nucleotide zur Resorption gelangen, im intermediären Stoffwechsel bei intakter Purinzuckerbindung desamidiert und oxydiert und gelangen als Harnsäure zur Ausscheidung.

So eindeutig diese Resultate unserer Untersuchungen auch scheinen, so stehen sie dennoch im Widerspruch mit einer experimentellen Feststellung, die von allen Untersuchern, welche

¹⁾ S. J. Thannhauser und A. Bommers, Diese Zeitschr., Bd. 91, S. 336 (1914).

²⁾ Löwi, Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. 44, S. 1 (1900).

³⁾ Soetbeer und Ibrahim, Diese Zeitschr., Bd. 35, S. 1 (1902).

⁴⁾ Wiechowski, Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. 60, S. 185 (1909).

⁵⁾ Umber und Retzlaff, Kongr. f. inn. Med. 1910, S. 436.

bisher Nucleinstoffwechselversuche anstellten, gemacht wurde. Es wurde festgestellt, daß sowohl bei einer oralen Nucleinsäuregabe als auch bei einer Thymusmahlzeit nur ein Bruchteil der in diesen Substanzen vorgebildeten Purine als Harnsäure ausgeschieden wird. Auch bei oraler Gabe¹⁾ von krystallisierten, reinen Purinen erscheinen ebenfalls nur 30 bis 45% der verfütterten Purine als Harnsäure im Urin und als unveränderte Purine im Kot wieder. Die größte Harnsäurevermehrung wurde bei oraler Gabe des relativ leicht wasserlöslichen Hypoxanthins und die geringste Harnsäuremehrausscheidung bei dem schwer löslichen Xanthin erzielt. Gegen Verfütterungsversuche von reinen Purinen als Kriterium für den Ablauf des Nucleinstoffwechsels muß der Einwand erhoben werden, daß sie von unrichtigen Voraussetzungen ausgehen, da freie Purine beim physiologischen Stoffwechsel dem Darm weder zugeführt werden, noch auch im Darm durch fermentative Prozesse entstehen. Dieser Einwand besteht nicht bei der oralen Zufuhr von Nucleinsäuren, die das Purin noch in intakter Purinzuckerbindung enthalten, und bei einer Briesmahlzeit. Die von den verschiedenen Forschern²⁾ erhaltenen Harnsäurewerte nach einer Briesmahlzeit oder nach Nucleinsäuregabe schwanken zwischen 10 bis 50%. Die meisten Untersucher erhielten 30 bis 35% der in den verfütterten Nucleinen enthaltenen Purine als Harnsäure im Urin wieder. Dazu kommen noch 1 bis 6% unverändert ausgeschiedene Purine im Kot. Das Harnsäuredefizit bei diesen Versuchen ist, wenn man die Kotpurine noch den Harnsäurewerten des Urines zurechnet, ca. 60%. Es ist verständlich, daß bei einem derartigen Harnsäuredefizit der Purinbilanz das Bestehen einer intermediären Urikolyse immer wieder angenommen wurde, zumal gleichzeitig mit den Nucleingaben die Gesamtstickstoffausscheidung und speziell die Harnstoffausscheidung³⁾ in die Höhe geht und als Folge eines

¹⁾ Literatur bei Wiechowski «Analyse des Harns» (Neubauer-Huppert), Brugsch-Schittenhelm, «Der Nucleinstoffwechsel», Jena 1910; Severin, Habilitationsschrift Breslau 1916.

²⁾ Siehe Zitat 1.

³⁾ Brugsch-Schittenhelm, «Der Nucleinstoffwechsel», Jena 1910, S. 44.

intermediären Harnsäureabbaues angesehen werden kann. Eine eindeutige, experimentelle Aufklärung des Defizits in der Purinbilanz des menschlichen Nucleinstoffwechsels konnte bei Ablehnung einer intermediären Purino- oder Urikolyse bisher nicht gegeben werden. Die Anschauung, daß ein Teil der zugeführten Nahrungspurine zum Kernaufbau verwendet wird, kann bei einem ausgewachsenen Individuum nur insoweit zutreffen, als es sich um den Ersatz der ständig durch Zellmauserung zu Verlust gehenden Purine handelt. Für die durch Zellabnutzungsvorgänge zerfallenden und zum Abbau gelangenden Nucleine dürfte eine annähernd äquivalente Menge Nahrungs nucleine zum Kernaufbau herangezogen werden, falls überhaupt die noch unbewiesene Annahme richtig ist, daß Nahrungspurine direkt zum Kernaufbau wieder verwendet werden. In der Purinbilanz sind dann die zum Aufbau verwendeten Mengen mit den abgebauten Mengen ausgeglichen, sofern nicht der Körper durch Wachstum mehr aufbaut als zersetzt. Das letztere Moment wird bei einem erwachsenen Menschen nur in ganz beschränktem Maße der Fall sein und nur in geringem Grade für die Erklärung des Purindefizits des Stoffwechsels heranzuziehen sein. Brugsch,¹⁾ der ursprünglich mit Schittenhelm für das physiologische Bestehen einer intermediären Urikolyse eintrat, zieht neuerdings ein anderes Moment zur Erklärung des Harnsäuredefizits heran. Er nimmt an, daß verschiedene Organe, besonders die Leber, Purine speichern und so einen Teil der exogenen Purine aufstapeln, um sie bei Fehlen der Nahrungs nucleine ins Blut wieder abzugeben. Eine überzeugende, experimentelle Begründung dieser Hypothese konnte bisher nicht erbracht werden. Die beiden Faktoren «Kernaufbaupurin» und «Speicherungspurin» können nach den bisherigen experimentellen Ergebnissen zum Ausgleich des Harnsäuredefizits nicht in ausreichender Weise angeführt werden. Nach unserer Ansicht besteht, nachdem durch die parenterale Zufuhr von Harnsäure und Nucleosiden die Unzerstörbarkeit des Purinkerns im intermediären Stoffwechsel wahrscheinlich wurde, wenig Aussicht, das Defizit in der Purin-

¹⁾ Brugsch, Med. Klinik 1913.

bilanz durch Vorgänge im intermediären Zellstoffwechsel zu erklären. Es scheint vielmehr derjenige Purinteil, der nicht als einfacher Nucleotidkomplex bei intakter Phosphorsäure-zuckerbildung zur Resorption gelangt, im Darne bereits eine Einwirkung zu erfahren, durch welche der Purinring aufgespalten wird. Da Fermente des Darmes nach den bisherigen Untersuchungen eine Purinolyse nicht bewirken, so könnte nur durch bakterielle Einwirkung eine derartige Veränderung der Purine erzielt werden. Baginski¹⁾ und Schindler²⁾ stellten bereits vor mehr als 30 Jahren fest, daß Purine durch Fäulnisbakterien so tiefgreifend verändert werden, daß sie mit den gebräuchlichen Purinfällungsreaktionen nur in Spuren mehr nachzuweisen sind. Schittenhelm und Schröter³⁾ untersuchten in einer Reihe von Versuchen die Zersetzungsprodukte, welche durch Einwirkung von *Bacterium coli*, von einem Gemisch der Darmflora und von Staphylokokken auf Hefenucleinsäure produziert werden. Die beiden Autoren fanden, daß in der Hauptsache elementarer Stickstoff aus den Purinen bei der Zersetzung durch die Darmbakterien entstehe. Dieses überraschende Ergebnis hat sich bei der Nachprüfung⁴⁾ als irrtümlich herausgestellt. — Sivèn⁵⁾ impfte Bouillonröhrchen mit Reinkulturen von *coli* und fand, daß der Gehalt der Bouillon an Purinen bereits nach 48 Stunden bis auf Bruchteile gesunken war. Durch die Versuche der genannten Untersucher war erwiesen, daß der Purinanteil der Nucleinsäuren durch die Darmflora zersetzt wird, jedoch wurde nicht mit Sicherheit festgestellt, welches stickstoffhaltige Abbauprodukt in der Hauptsache bei der bakteriellen Purinolyse entsteht. Für die Beurteilung des menschlichen Nucleinstoffwechsels schien uns die Klarstellung der bakteriellen Purinolyse von Bedeutung.

¹⁾ Baginski, Diese Zeitschr., Bd. 8, S. 395 (1884).

²⁾ Schindler, Diese Zeitschr., Bd. 13, S. 441 (1889).

³⁾ Schittenhelm und Schröter, Diese Zeitschr., Bd. 35, S. 162 (1902); Bd. 39, S. 203 (1903); Bd. 40, S. 62 u. 70 (1904); Bd. 41, S. 284 (1904).

⁴⁾ C. Oppenheimer, Diese Zeitschr., Bd. 41, S. 3 (1904).

⁵⁾ Sivèn, Pflügers Arch., Bd. 157, S. 582 (1914).

Gelingt es, durch Einwirkung von Bakterien der menschlichen Darmflora Purine in wesentlicher Menge zu einem Harnstoffbildner abzubauen, so dürfte es wahrscheinlich sein, daß die bei oraler Gabe von Nucleinsäure beobachtete Mehrausscheidung von Harnstoff und das Harnsäuredefizit dem Einfluß der Darmbakterien zuzuschreiben ist.

In einer Reihe von Versuchen ließen wir ein Gemisch von Darmbakterien in Lösungen wachsen, die als einzigen stickstoffhaltigen Bestandteil die Nucleoside Guanosin, Adenosin oder Inosin enthielten. Die Nucleoside sind für derartige Versuche besser geeignet als die freien Purine, da man die Nucleoside in wässriger Lösung dem Nährsubstrat zusetzen kann, während man die Purine in alkalischer Lösung oder als Halogensalze zugeben müßte und so die physiologischen Vorbedingungen verändern würde. Gegenüber den Nucleinsäuren, die sich ebenso in wässriger Lösung anwenden ließen, bieten die Nucleoside den Vorteil, daß sie reine, krystallisierte Körper sind. Quantitative Bestimmungen der festgestellten Abbauprodukte lassen deshalb eindeutige Rückschlüsse auf die Menge der durch die Bakterien veränderten Purine zu. Die Nährlösungen enthielten außer dem jeweils zugesetzten Nucleosid nur anorganische Bestandteile und waren hinsichtlich der anorganischen Zusammensetzung einer Uschinski-Lösung nachgebildet. Die Nährlösung wurde jeden zweiten Tag mit einem Tropfen einer Aufschwemmung von Darmbakterien geimpft und im Brutschrank bei 37° gehalten. Die Aufschwemmung der Darmbakterien wird durch Impfen eines Bouillonröhrchens mit einer Öse frischen Stuhles und 24stündigen Bebrütens bei 37° hergestellt und zu jeder Impfung frisch bereitet.

Durch verschiedene Tastversuche haben wir zuerst festgestellt, daß die bakterielle Einwirkung auf die Nucleoside den Purinanteil weder zu Pyrimidinen noch zu einem Ureid zersetzt. Wir erkannten bald, daß als hauptsächliches Endprodukt der bakteriellen Zersetzung der Purine durch die Darmflora Ammoniak entsteht. Nach dieser Erkenntnis war die Methodik eine einfache, das entstandene Ammoniak quantitativ festzuhalten. In einer Reihe von quantitativen Bestim-

mungen konnten wir zeigen, daß der Stickstoff der Nucleoside durch die Bakterienflora des menschlichen Darmes nach 20 Tagen zu 70 bis 100% in Ammoniak verwandelt ist. Gegen die Versuchsdauer von 20 Tagen könnte man den Einwand erheben, daß sie zu lang ist, um Rückschlüsse auf die physiologischen Verhältnisse bei der Darm-passage zu ziehen. Die lange Versuchszeit dürfte aber in Anbetracht des frugalen anorganischen Nährbodens gerechtfertigt erscheinen. Die bakterielle Purinolyse ist eine vollständige. Das entstehende, stickstoffhaltige Endprodukt, das Ammoniak, ist ein Harnstoffbildner. Nach diesen Befunden dürfte es wahrscheinlich sein, daß nach oraler Nucleinsäuregabe bei Menschen ein wesentlicher Teil des Harnsäuredefizits in der Purinbilanz und die gleichzeitige Harnstoffmehrausscheidung auf die bakterielle Purinolyse im Darm zurückzuführen ist.

Experimenteller Teil.

Zu unseren Versuchen wurde eine Nährlösung folgender Zusammensetzung benutzt.

Destilliertes Wasser	700 ccm
K_2HPO_4	2,3 g
NaCl	6,0 »
$CaCl_2$	0,1 »
$MgSO_4$	0,3 ».

Zu dieser Lösung wurde als einziger organischer Bestandteil und als einziges stickstoffhaltiges Nährsubstrat 1,5 g krystallisiertes Nucleosid (Guanosin, Adenosin oder Inosin),¹⁾ in 300 ccm heißem Wasser gelöst, zugesetzt. Die ganze Nährlösung, welche nunmehr 1000 ccm beträgt, ist bei 37° klar. Sollten sich vor der Animpfung Spuren eines flockigen Niederschlages abscheiden, so wird von diesem abfiltriert. Man bringt

¹⁾ Adenosin und Guanosin stellten wir nach den Angaben von Levene und Jacobs (Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 42, S. 2703, 1909) her. Inosin wurde aus Liebigs Fleischextrakt gewonnen. Das in diesen Versuchen verwendete Inosin entstammt einem Präparat, das von dem einen von uns bereits vor 5 Jahren hergestellt wurde. Schmelzp. 215°.

die Lösung in einen Filtrierstutzen, der mit einem einfach durchbohrten Gummistopfen verschlossen ist, durch den ein Luftzuleitungsrohr bis auf den Boden des Gefäßes reicht. Der Saugansatz des Filtrierstutzens mit der Nährlösung wird mit einem zweiten ebenfalls mit durchbohrten Gummistopfen und Luftzuleitungsrohr versehenen kleineren Filtrierstutzen derartig verkuppelt, daß der Saugansatz des ersten Filtrierstutzens durch ein Gummischläuchchen mit dem Luftzuleitungsrohr des zweiten Filtrierstutzens verbunden ist. Der zweite, kleinere Stutzen dient als Vorlage und wird mit $\frac{1}{10}$ -n-Säure und einigen Tropfen Methylorange als Indikator beschickt. Beide Stutzen wurden in einen Brutschrank von 37° gestellt und die Nährlösung jeden zweiten Tag mit einer Aufschwemmung von Bakterien der Darmflora geimpft. Die Aufschwemmung der Darmbakterien wird zu jedem Impfen frisch hergestellt, indem man in ein Bouillonröhrchen eine Öse frischen Kotes gibt und 24 Stunden bei 37° stehen läßt. Von dieser Aufschwemmung wird dann auf die Nährlösung überimpft. In der Nährlösung gehen die überimpften Bakterien bereits nach 24 Stunden reichlich an. Nach 3- bis 4-tägigem Stehen scheiden sich in der Nährlösung geringe Mengen eines krusigen, mikrokrySTALLINISCHEN Niederschlages aus, die im Verlauf des Versuches wieder in Lösung gehen. Nach 20-tägigem Stehen ist die Nährlösung von den gewachsenen Bakterien stark getrübt. Am Boden der Flüssigkeit hat sich ein geringer Bodensatz abgesetzt. Die beiden verkuppelten Stutzen werden aus dem Brutschrank herausgenommen, und mit einer Wasserstrahlpumpe 24 Stunden Luft durchgesaugt, sodaß ein Teil des entstandenen Ammoniaks durch die im kleinen Stutzen vorgelegte Säure gebunden wird. Da der größere Teil des entstandenen Ammoniaks in der Nährlösung durch das Kaliumphosphat chemisch gebunden ist und durch einfaches Luftdurchleiten nicht ausgetrieben wird, muß man die ganze Lösung stark alkalisch machen und abermals Luft durchleiten. Kürzer und einfacher verfährt man, wenn man 20 ccm der Nährlösung nach dem Luftdurchsaugen abpipettiert und in dieser kleinen Menge das Ammoniak durch Alkalischemachen mit fester Krystallsoda und

Übertreiben in eine Vorlage von 20 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure bestimmt. Der durch einfaches Luftdurchsaugen in der ersten Vorlage und der durch die eigentliche Ammoniakbestimmung gefundene Wert wird addiert. Da außer den Nucleosiden kein anderer stickstoffhaltiger Körper in der Nährlösung vorhanden war, so kann der auf diese Weise bestimmte Ammoniakstickstoff nur aus dem Purinanteil der Nucleoside stammen.

Versuch 1.

1000 ccm Nährlösung mit 1,5 g Guanosin werden 20 Tage jeden 2. Tag mit Darmbakterien geimpft und in der beschriebenen Apparatur im Brutschrank bei 37° stehen gelassen. Die Verarbeitung geschieht in der angegebenen Weise.

Zum Zurücktitrieren der vorgelegten 250 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure werden nach 24 stündigem Luftdurchleiten 240 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Lauge benötigt.

Verbraucht wurden also 10 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure = 0,014 g N. 20 ccm der Nährlösung wurden mit fester Krystallsoda kalt gesättigt, 20 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure vorgelegt und 24 Stunden Luft durchgeleitet. (Vor die Luftzuleitungsröhre der Nährlösung wird bei allen Versuchen eine Waschflasche mit verdünnter Salzsäure zur Absorption des atmosphärischen Ammoniaks gelegt.) Zum Zurücktitrieren der vorgelegten 20 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure werden 16,5 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Lauge benötigt.

20 ccm Nährlösung verbrauchen somit 3,5 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure = 0,0049 g N.

In 1000 ccm Nährlösung sind 0,245 g N als Ammoniakstickstoff enthalten. Als Gesamtammoniakstickstoff wurden gefunden $0,014 \text{ g N} + 0,245 \text{ g N} = 0,259 \text{ g N}$.

Da in 1,5 g Guanosin 0,3701 g N enthalten sind, entspricht der als Ammoniakstickstoff gefundene Wert von 0,259 g N 70% des im Guanosin enthaltenen Stickstoffs.

Versuch 2.

1000 ccm Nährlösung mit 1,5 g Guanosin werden 14 Tage jeden 2. Tag mit Darmbakterien geimpft und in der an-

gegebenen Weise behandelt. Zum Zurücktitrieren der vorgelegten 250 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure werden nach 24 stündigem Luftdurchleiten 240 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Lauge benötigt.

Verbraucht wurden also 10 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure = 0,014 g N. 20 ccm der Nährlösung wurden mit Krystallsoda kalt gesättigt, 20 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure vorgelegt und 24 Stunden Luft durchgeleitet. Zum Zurücktitrieren der vorgelegten 20 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure wurden 16,6 ccm n-Lauge benötigt.

20 ccm Nährlösung verbrauchen somit 3,4 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure = 0,00476 g N.

In 1000 ccm Nährlösung sind 0,238 g Stickstoff als Ammoniakstickstoff enthalten.

Als Gesamtammoniakstickstoff wurden gefunden 0,014 g N + 0,238 g N = 0,252 g N.

Da in 1,5 g Guanosin 0,3701 g N enthalten sind, entspricht der als Ammoniakstickstoff gefundene Wert von 0,252 g N 67% des im Guanosin enthaltenen Stickstoffs.

Versuch 3.¹⁾

1000 ccm Nährlösung mit 1,5 g Adenosin werden 20 Tage jeden 2. Tag mit Darmbakterien geimpft und in der angegebenen Weise behandelt.

Zum Zurücktitrieren der vorgelegten 100 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure werden nach 24 stündigem Luftdurchleiten 7 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Lauge benötigt.

Verbraucht wurden somit 93 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure = 0,1302 g N. 20 ccm der Nährlösung wurden mit Krystallsoda kalt gesättigt, 20 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure vorgelegt und 24 Stunden Luft durchgeleitet. Zum Zurücktitrieren der vorgelegten 20 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure wurden 17 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Lauge benötigt.

20 ccm Nährlösung verbrauchen somit 3 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure = 0,0042 g N.

In 1000 ccm Nährlösung sind 0,210 g N als Ammoniakstickstoff enthalten. Als Gesamtammoniakstickstoff wurden gefunden 0,1302 g N + 0,210 g N = 0,3402 g N.

¹⁾ Herr Dr. Otto Wuth hatte die Liebenswürdigkeit, diesen Versuch auszuführen.

Da in 1,5 g Adenosin 0,3933 g N enthalten sind, entspricht der als Ammoniakstickstoff gefundene Wert von 0,3402 g N 87% des im Adenosin enthaltenen Stickstoffs.

Versuch 4.

1000 ccm Nährlösung mit 1,5 g Inosin (Hypoxanthosin) wurden 20 Tage jeden 2. Tag mit Darmbakterien geimpft und in der angegebenen Weise behandelt.

Zum Zurücktitrieren der vorgelegten 200 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure wurden 200 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Lauge verbraucht. Ammoniakstickstoff in der Vorlage = 0.

20 ccm der Nährlösung werden mit Krystallsoda kalt gesättigt, 20 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure vorgelegt und 24 Stunden Luft durchgeleitet.

Zum Zurücktitrieren der vorgelegten 20 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure werden 15,7 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Lauge benötigt.

20 ccm der Nährlösung verbrauchen somit 4,3 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure = 0,0062 g N.

In 1000 ccm Nährlösung sind also 0,310 g Stickstoff als Gesamtammoniakstickstoff enthalten.

Da in 1,5 g Inosin 0,3134 g N enthalten sind, entspricht der als Ammoniakstickstoff gefundene Wert von 0,310 g N 100% des im Inosin enthaltenen Stickstoffs.

Versuch 5.

1000 ccm Nährlösung mit 1,5 g Guanosin, die an Stelle von 2,3 g Bikaliumphosphat die gleiche Menge Monokaliumphosphat enthält, wurde in der gleichen Weise verarbeitet wie die vorhergehenden Versuche. Wie vorauszusehen war, befand sich in der Vorlage wegen des in der Nährlösung enthaltenen Monokaliumphosphates kein absorbiertes Ammoniak.

25 ccm vorgelegte $\frac{1}{10}$ -n-Säure verbrauchte 25 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Lauge. Das entstandene Ammoniak wird in der Nährlösung durch das Monokaliumphosphat chemisch gebunden.

20 ccm Nährlösung werden mit Krystallsoda kalt gesättigt, 20 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure vorgelegt und 24 Stunden Luft durchgeleitet. Zum Zurücktitrieren der vorgelegten 20 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure werden 16 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Lauge benötigt.

20 ccm der Nährlösung verbrauchen somit 4 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Säure = 0,0056 g N.

In 1000 ccm Nährlösung sind 0,280 g N als Gesamtammoniakstickstoff enthalten.

Da in 1,5 g Guanodin 0,3701 g N enthalten sind, entspricht der als Ammoniakstickstoff gefundene Wert von 0,280 g N 76% des im Guanodin enthaltenen Stickstoffs.
