

Zur Chemie der Bakterien.

V. Mitteilung.

Über die chemische Zusammensetzung eines Wasserbacillus.

Von

Sakae Tamura (Tokio).

(Aus dem Hygienischen und dem Physiologischen Institut der Universität Heidelberg.)

Der Redaktion zugegangen am 9. März 1914.)

Material.

Für die Untersuchungen dienten aus Neckarwasser isolierte, kurze Bacillen, die gramnegativ sind, keine Sporen bilden und Gelatine nicht verflüssigen. Diese Bacillen wurden zu den Versuchen benutzt, weil sie rasch und üppig auf gewöhnlicher Fleischbouillon wachsen, auf der sie schon nach 24 Stunden ein ziemlich dickes, farbloses, halbdurchsichtiges Häutchen bilden. Die Bouillon wird dabei stark getrübt und riecht faulig.

Die Hauptschwierigkeit bestand darin, ausreichende Mengen der trockenen Bakterienkörper zu gewinnen, da die Ausbeute an Trockensubstanz geringer war als bei den bisher von mir untersuchten Bakterien. Die schwach alkalische Rindfleischbouillon wurde in nicht zu hoher Schicht in Erlenmeyersche Kolben gefüllt und mit dem Wasserbacillus geimpft. Nach dreitägiger Kultivierung bei 36° C. wurden die Bacillen von den Nährmedien abfiltriert und gründlich gewaschen. Die Filtration und Waschung war bei diesem Bakterium besonders schwierig und dauerte 12 Stunden pro 5 l Bouillon. Die ausgewaschenen Bakterien wurden im Trockenschrank bei 36° C. völlig getrocknet. Es ergab sich dabei eine ganz braune feste Masse (gegen 3 g aus 5 l), die nicht leicht zu pulverisieren war.

Ich habe mit dieser Methode 33 g Wasserbacillus in getrocknetem Zustande erhalten. Dieses Material enthielt 10,12% Stickstoff.

Lipoide Stoffe.

Die chemischen Untersuchungen der getrockneten Bakterienkörper wurden in ganz gleicher Weise wie bei dem Tuberkel-

bacillus¹⁾ und Diphtheriebacillus²⁾ vorgenommen. 30 g der im Vakuum über Schwefelsäure getrockneten Wasserbacillen wurden zuerst mit Äther («Extrakt I») und dann mit Alkohol («Extrakt II») extrahiert.

Das ätherische Extrakt «I» war hellgelb und enthielt geringe Mengen von Phosphatiden, zeigte aber keine Cholesterinreaktion.

Das alkoholische Extrakt «II» war bräunlich gelb, daraus wurde 0,128 g Phosphatid mit der Methode der Ätherlösung und Acetonfällung isoliert. Die Analyse dieser Substanz führt zu folgenden Ergebnissen:

0,1280 g Substanz nach Neumann auf Phosphor untersucht, verbraucht 9,6 ccm $n/2$ Natronlauge, d. i. 4,155% P.

Die Stickstoffbestimmung wurde nicht ausgeführt, aber nach dem Phosphorgehalt kann man vermuten, daß es sich um Lecithin handelt.

Unter den übrigen lipoiden Stoffen, die im alkoholischen Extrakt «II» gelöst waren, wurde keine Substanz gefunden, welche Cholesterinreaktion zeigte.

Proteinstoffe.

Die in oben beschriebener Weise entfetteten und getrockneten Wasserbacillen, deren Menge 26 g betrug, wurden nun mit einer Mischung von 2 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 bräunlich gelbe Flüssigkeit («A») wurde von diesem Niederschlag («B») abfiltriert.

Das Filtrat (A) war klar und zeigte deutliche Biuretreaktion. Um die gelösten Eiweißkörper zu entfernen, wurde das Filtrat (A) mit der gleichen Menge Alkohol gefällt und von dem Niederschlag abfiltriert. Dieser neue Niederschlag (C) wurde mit dem Niederschlag (B) vereinigt.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 87, S. 85.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 89, S. 289.

Das neue Filtrat, das von Niederschlag (C) abfiltriert war, reduzierte Kupferlösung bei alkalischer Reaktion und zeigte schwache Orcinsalzsäurereaktion. Die Untersuchung über die reduzierenden Substanzen und Nucleinbasen wurde in gleicher Weise wie bei Diphtheriebacillen vorgenommen, führte aber der geringen Substanzmenge wegen zu keinem sicheren Ergebnis.

Der durch Wasser gefällte Niederschlag (B + C) wurde mehrmals mit verdünntem Alkohol gewaschen, bis die Reaktion des Waschwassers nicht mehr sauer war. Der gründlich gewaschene Niederschlag wurde nochmals einer ausgiebigen Extraktion mit Alkohol und Äther unterworfen. Die aus 26 g entfetteter Wasserbacillen erhaltene Menge des Eiweißes betrug 19,5 g. Diese Masse enthielt 12,2% Stickstoff und bestand im wesentlichen aus Eiweiß. Fast alle bekannten Eiweißreaktionen waren positiv; nur die Schwefelbleireaktion war negativ. Die Masse war teilweise löslich in verdünnter Schwefelsäure und verdünnter Alkalilösung, aber nicht in Wasser und verdünnter Kochsalzlösung.

Die Hydrolyse dieser Eiweißmasse führte ich folgendermaßen aus: 19 g Substanz wurden mit 25% iger Schwefelsäure am Rückflußkühler 14 Stunden lang erhitzt. Die ausgeschiedene geringe Menge einer schwarzen Masse, welche gegen 0,5 g betrug, wurde nach dem Erkalten abfiltriert. Das Filtrat wurde nach dem Verfahren von A. Kossel und F. Kutscher ganz ebenso wie bei Diphtheriebacillus verarbeitet. Der Gesamtstickstoff in dem Filtrat betrug 2,312 g.

Diaminosäurefraktion: Aus dem mittels Phosphorwolframsäure abgeschiedenen Niederschlag wurden mit Hilfe des bekannten Verfahrens Arginin, Histidin und Lysin dargestellt. Der Gesamtstickstoff in dieser Fraktion wog 0,448 g.

Die Menge des Argininpikrolonats betrug 1,75 g

„ „ „ Histidinpikrolonats „ 0,21 „

Das Lysinpikrat wog 1,02 „

Monoaminosäurefraktion: Der gesamte Stickstoff in dieser Fraktion betrug 1,135 g. Darin wurden nur Tyrosin und Prolin sicher nachgewiesen; der Versuch, die übrigen Aminosäuren

mit der gleichen Methode wie bei dem Diphtheriebacillus in reinem Zustand zu isolieren, war in diesem Falle nicht so leicht ausführbar.

Tyrosin: Die durch Baryt von Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure befreite Lösung wurde verdampft. Die Ausbeute an ziemlich reinen Tyrosinkristallen betrug 0,15 g. Das Präparat wurde nochmals umkristallisiert und dann analysiert.

2,75 mg Substanz: 0,183 ccm N (10° C. 753 mm).

$C_9H_{11}NO_3$. Ber. N: 7,74%; Gef. N: 7,95%.

Prolin: Die in Äthylalkohol lösliche Aminosäure, die 0,52 g betrug, wurde in der bekannten Weise in die Phenylisocyanatverbindung, sowie in das entsprechende Hydantoin übergeführt. Das Hydantoin zeigte den Schmelzpunkt 143° C.

Die Analyse des Hydantoins ergab folgendes:

3,47 mg Substanz: 0,373 ccm N (11° C. 752 mm)

$C_{12}H_{12}N_2O_2$. Ber. N: 12,96%; Gef. N: 12,79%.

Die unbedeutende Menge von lipoiden Stoffen, welche nach der Isolierung der Phosphatide verblieben war, wurde in möglichst wenig Äther gelöst und durch Alkohol gefällt. Über die chemische Natur dieses in Alkohol unlöslichen Niederschlages ließ sich jedoch wegen seiner geringen Menge nichts ermitteln. Färbeversuche ergaben, daß er weder säurefest noch grampositiv war.

Zusammenfassung.

Das durch Alkoholextraktion aus den untersuchten gramnegativen Wasserbacillen erhaltene Phosphatid ist vielleicht ein Monoaminomonophosphatid, und zwar Lecithin.

Lipoider Stoffe, welche Cholesterin-Reaktion zeigen, wurden nicht gefunden, ebensowenig säurefestes Mykol oder andere grampositive Lipide.

Das Vorhandensein von reduzierender Substanz, die Orcin-salzsäurereaktion zeigt, wurde festgestellt.

Unter den Eiweißbausteinen wurden die folgenden Aminosäuren gefunden: Arginin, Histidin, Lysin, Tyrosin, l-Prolin und durch Reaktion Tryptophan. Dagegen trat keine Schwefelblei-reaktion ein.

Tabelle I.

	In 19 g Eiweiß des Wasserbacillus	% in Eiweiß
Arginin	0.760	4,00
Histidin	0,078	0,41
Lysin	0.403	2,12

Tabelle II.

	In 19 g Eiweiß g	Berechnet in 100 g Eiweiß g	Berechnet in 100 g N %
Gesamtstickstoff	2,312	12,16	100,0
A. Basenstickstoff	0,4379	2,30	18,9
in Arginin	0,2451	1,30	10,6
› Histidin	0,0211	0,11	0,9
› Lysin	0,0754	0,39	3,2
› Ammoniak	0,0953	0,50	4,1
B. Monoaminosäure-N	1,1350	5,97	49,1
in Tyrosin	0,0116	0,06	0,5
› Prolin	0,0633	0,33	2,6
andere Aminosäuren	1,0601	5,58	46,0
C. N in unbekannter Form	0,7391	3,89	32,0
› Humin	0,6309	3,32	27,1
› Silberniederschlag	0,0790	0,41	3,4
› Filtrat des Lysinpikrates	0,0290	0,15	1,3

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

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