

Bacteriologisch-Chemische Untersuchungen der Tuberkelbacillen

von

Dr. Albert Hammerschlag.

Aus dem Laboratorium des Prof. Nencki in Bern.

(Vorgelegt in der Sitzung am 13. December 1888.)

Die interessanten Ergebnisse, welche die Untersuchungen über den Chemismus pathogener Bacterien in den letzten Jahren zu Tage gefördert haben, lassen es wünschenswerth erscheinen, dass derartige Untersuchungen auf eine möglichst grosse Anzahl verschiedener Arten ausgedehnt werden, da die einzelnen Resultate ihren Hauptwerth erst durch Vergleichung mit anderen erhalten, und man nur dadurch erkennen kann, was als specielle Eigenthümlichkeit einer bestimmten Spaltpilzart aufzufassen ist.

Da eine derartige Untersuchung über Tuberkelbacillen bisher noch nicht ausgeführt worden ist, so übernahm ich, der Anregung des Herrn Prof. Nencki folgend, mit grossem Vergnügen die Bearbeitung dieses Themas.

Die bacteriologisch-chemische Untersuchung einer Spaltpilzart hat drei Aufgaben zu erfüllen: sie hat zunächst die Wachstumsbedingungen der betreffenden Bacterien festzustellen, zu untersuchen, welche Nahrungsmittel für dieselben unumgänglich nothwendig und welche am vortheilhaftesten sind, sie hat zweitens die chemische Zusammensetzung, und endlich die Stoffwechselproducte derselben zu ermitteln.

Die Wachstumsbedingungen der Tuberkelbacillen sind ganz eigenartige, und es ist bekannt, welche Schwierigkeiten Koch bei der Züchtung derselben zu überwinden hatte. Einen wesentlichen Fortschritt auf diesem Gebiete bildete die Ent-

deckung von Nocard und Roux¹, dass ein Zusatz von Glycerin das Wachsthum der Tuberkelbacillen wesentlich fördert. Die genannten Autoren fanden, dass nicht bloss mit Glycerin versetztes Blutserum einen viel besseren Nährboden für Tuberkelbacillen darbietet, als das einfache Serum, sondern dass die Bacillen auch auf Fleischwasseragar oder Bouillon, die mit 5% Pepton und 5% Glycerin versetzt sind, ausgezeichnet wachsen, schon am vierten bis fünften Tage nach der Impfung eine deutliche Vermehrung zeigen und nach circa 5 Wochen eine reichliche Cultur liefern.

Anknüpfend an diese Arbeit versuchte ich die Tuberkelbacillen zum Zwecke der chemischen Untersuchung in verschiedenen Nährmedien im Grossen zu züchten, zunächst in den von Nocard und Roux angegebenen.

Zu den Versuchen mit Glycerinagar wurden Kölbchen von circa 200 cm^3 Inhalt verwendet, und mit 50—70 cm^3 Agar gefüllt, welchen durch Schrägstellung eine möglichst grosse Oberfläche verliehen wurde.

In solchen Kölbchen bilden sich auf der Oberfläche des Agar am vierten bis fünften Tage nach der Impfung (bei Bruttemperatur) kleine weissliche Knötchen, die allmählig grösser werden und endlich zu eigenthümlichen erhabenen Wülsten verschmelzen, welche in vielfach gewundenen, sich kreuzenden Zügen angeordnet sind, zwischen denen die Oberfläche des Agar von einer dünnen weisslichen Schicht bedeckt ist. Nach circa drei Wochen ist zumeist die ganze Oberfläche des Agar vollkommen bedeckt.

In Glycerin-Bouillon bildet sich am fünften bis siebenten Tage ein leichter Bodensatz, der allmählig grösser wird, wobei die Flüssigkeit selbst vollkommen klar bleibt. Nach circa siebenwöchentlichem Wachsthum bildet die Colonie einen gleichmässigen, schwach rosaroth gefärbten Niederschlag, der den Boden des Kölbchens in einer, wenige Millimeter hohen Schichte bedeckt, eine etwas zähe, schleimige Consistenz hat und beim vorsichtigen Neigen des Glases an der Wand haften bleibt.

Es schien von Interesse zu sein, zu untersuchen, ob das Glycerin in den Nährlösungen durch andere ähnliche Substanzen

¹ Annales de l'institut Pasteur, 1885.

zu ersetzen sei und hiebei musste man zunächst an die Kohlehydrate denken, denen das Glycerin in seinem Verhalten im Stoffwechsel nahe steht. Die Versuche zeigten in der That, dass Nährlösungen, welche an Stelle des Glycerin's Mannit, Traubenzucker oder Glycogen enthielten, einen guten Nährboden für Tuberkelbacillen abgeben, wenn auch das Wachstum in denselben nicht so rasch vorwärts schreitet, wie bei Zusatz von Glycerin. Eine sehr bequem darstellbare Nährlösung für Tuberkelbacillen und Bacterien überhaupt bildet eine Hefeabkochung, wie sie schon früher von Pasteur zu Versuchen mit Saccharomyceten verwendet worden ist. Zur Bereitung derselben wird gewöhnliche Bierhefe mit dem zehnfachen Volumen Wasser decantirt, nach dem Abgiessen des Wassers der Rückstand mit dem zehn- bis fünfzehnfachen Volumen Wasser einmal aufgekocht und nach dem Erkalten filtrirt. Wenn man nur geringe Mengen (circa ein halbes Liter) auf einmal verarbeitet und längeres Kochen vermeidet, erhält man Lösungen, die nur schwach gelblich gefärbt sind. Ein Zusatz von Pepton ist überflüssig, da die Hefe genügende Mengen Pepton enthält.

In einer derartigen Abkochung, die mit 5% Glycerin versetzt ist, vermehren sich die Tuberkelbacillen sehr rasch, und man erhält schon nach vier- bis fünfwöchentlichem Wachstum reichliche Culturen. Dieselben unterscheiden sich im Aussehen etwas von den oben beschriebenen Bouillon-Culturen, indem hier die Bacillen grössere, zähe, fest zusammenhängende Klumpen bilden.

Die erwähnte Hefeabkochung dürfte sich ihrer leichten Darstellbarkeit und Billigkeit wegen zu bacteriologischen Untersuchungen, als Ersatz für die Fleischwasser-Peptonlösung ganz gut eignen, da man durch Kochen von Agar oder Gelatine mit einem derartigen Hefedecoct sehr leicht einen festen Nährboden darstellen kann, auf welchem (wie ich mich durch Versuche überzeugte) die verschiedensten Bacterienarten sehr gut wachsen.

Auch in einer Lösung, die in 100 Theilen destillirten Wassers, 2 Theile Pepton, 6 Gewichtstheile Glycerin und 1 Theil Salze (bestehend aus phosphorsaurem Kali, phosphorsaurem Kalk, Chlornatrium und etwas schwefelsaurer Magnesia) enthält, lassen sich die Tuberkelbacillen ganz gut züchten.

Ich möchte an dieser Stelle erwähnen, dass ich mich stets durch mikroskopische Untersuchung von der Reinheit der Tuberculturen und durch Thierversuche von ihrer pathogenen Wirkung überzeugte. Bei der mikroskopischen Untersuchung liessen sich stets zahlreiche sporenhaltige Bacillen erkennen.

Zum Zwecke der chemischen Analyse mussten die Bacterien zunächst von den Nährmedien isolirt werden. Bei den Culturen in Nährlösungen gelingt dies leicht, indem man den grössten Theil der Flüssigkeit abhebt, den Rest durch Leinwand filtrirt, und mit essigsäurehaltigem Wasser nachwäscht. Von den Culturen auf Agar wurde der oberflächliche Belag mit einem Spatel vorsichtig abgehoben und mit einer grösseren Menge Wasser, dem einige Tropfen Essigsäure zugesetzt waren, mehrere Stunden auf dem Wasserbade erwärmt. Dabei gingen die anhaftenden Agarstückchen in Lösung, die Bacterien setzten sich zu Boden und konnten abfiltrirt werden. Die frischen Bacterien hatten eine schwach rosarothte Färbung, einen angenehmen obstartigen Geruch (der noch deutlicher an den Nährlösungen selbst bemerkbar war) und bildeten zähe, schleimige Klümpchen.

Es wurden im Ganzen zwei Analysen von zwei verschiedenen Culturereihen ausgeführt, die erste Analyse mit den Ernten von sechs Culturen auf Agar und vier auf Bouillon, die circa zwei Monate alt waren, die zweite mit den Ernten aus acht Kölbchen mit Agar, zehn grösseren Kolben mit Hefeabkochung und zwei Kolben mit Bouillon, die $1\frac{1}{2}$ —3 Monate alt waren. Die Ausbeute im ersten Falle betrug $7\frac{1}{2}$ g, im zweiten 20 g.

Die Analysen ergaben folgende Resultate:

I.

Gewicht der frischen Bacterien	7·6623 g
Nach dem Trocknen zum constanten Gewichte bei 105° C.	0·8648 „
Wassergehalt	6·7975 g
Zur Analyse verwendet	0·8573 „
In Alkohol lösliche Stoffe	0·2420 „
In Äther lösliche Stoffe	0·0015 „
(Summe)	0·2435 g

Mit dem Reste wurde eine Elementaranalyse und eine Aschenbestimmung vorgenommen.

0.2373 g im offenen Rohr verbrannt ergaben: 0.413 g CO₂, 0.1583 g H₂O und 0.019 g Asche.

0.2296 g ergaben: 18 cm³ N. bei 692 mm Bst und 19°5 T entsprechend 0,01919 g N.

II.

Gewicht der frischen Bacterien	10.803 g a
In Äther lösliche Stoffe	0.214 „ b
Gewicht der nach der Extraction mit Äther bis zum constanten Gewicht getrockneten Bacterien	1.618 „ c
Gesamt-Trockenrückstand der Bacterien	1.832 „ (b+c)
In Alkohol lösliche Stoffe	0.2662 „ d
In Äther + in Alkohol lösliche Stoffe	0.4802 „ (b+d)

Daraus ergibt sich:

	I.	II.
Wassergehalt	88.7	83.1
In Alkohol + in Äther lösliche Stoffe	28.2	26.2 (auf Trockensubstanz be- rechnet)
		(Lecithin, Fette, giftige Sub- stanz).

Die elementare Zusammensetzung des in Alkohol und Äther unlöslichen Theils, aus Eiweiss, Cellulose und Asche bestehend, war wie folgt:

$$\begin{aligned} \text{C.} &= 51.62\% \\ \text{H.} &= 8.07\% \\ \text{N.} &= 9.09\% \quad (\text{auf aschefreie Substanz berechnet.}) \\ \text{Asche} &= 8.0\% \end{aligned}$$

Die Analyse I. wurde in der Weise ausgeführt, dass die Bacillen von der Leinwand abgehoben, auf ein getrocknetes und gewogenes Filter gebracht und bis zum constanten Gewichte bei 105° C. getrocknet wurden. Hierauf wurden sie im Extractionsapparat circa acht Stunden mit Alkohol und ebensolange mit Äther extrahirt.

Bei der II Analyse wurden die Bacterien frisch gewogen und sogleich mit Äther extrahirt, dann bis zum constanten

Gewichte getrocknet, und aus dem Gewichte des Ätherrückstandes + dem Gewichte der nach der Extraction getrockneten Bacterien der gesammte feste Rückstand berechnet. Nach der Trocknung wurden die Bacterien mit Alkohol fünf Stunden extrahirt.

Auffallend war vor Allem die grosse Menge der in Alkohol und Äther löslichen Stoffe, durch welche sich die Tuberkelbacillen in ihrer chemischen Zusammensetzung von den bisher untersuchten Bacterienarten wesentlich unterscheiden. Während Fäulnissbacillen nach Nencki¹ im Mittel 7·3%, Pneumococcen nach Brieger² 1·7%, Milzbrandbacillen 7·8% (Adeline Dyrmond), Bacillen der multiplen Gangrän 10·1% (Bovet) in Alkohol und Äther lösliche Stoffe enthalten, haben wir hier im Mittel 27%.

Da bei der ersten Analyse die in Alkohol lösliche Substanz zu einer chemischen Prüfung nicht ausreichte, wurde dieselbe mit stark verdünntem Alkohol gekocht, und von dem Filtrate circa die Hälfte einem kleinen Meerschweinchen subcutan injicirt.

Drei Stunden nach der Injection zeigten sich folgende Vergiftungserscheinungen: Das Thier lag auf der Seite, unfähig sich aufzurichten oder zu laufen, Puls und Respiration waren stark beschleunigt, an den oberen und unteren Extremitäten zeigten sich klonische Krämpfe und eigenthümliche Laufbewegungen, die Reflexerregbarkeit war aber etwas erhöht. In den nächsten Stunden breiteten sich die Krämpfe auf die Nacken- und Kaumusculatur aus, nahmen dann allmählig tonischen Charakter an, es traten nun Trismus, Opisthotonus und Streckkrämpfe auf, und circa zwölf Stunden nach der Injection ging das Thier zu Grunde. Ein ähnliches Resultat ergab ein zweiter Versuch, welcher mit dem Reste der Lösung an einem Kaninchen angestellt wurde, nur traten hier die Krämpfe erst 36 Stunden nach der Injection auf.

Bei der II. Analyse wurde der Rückstand des Ätherextractes nochmals mit reinem Äther aufgenommen, filtrirt, im Filtrate der Äther verdunstet, der Rückstand, welcher Cholestearin, Fett und Lecithin enthalten konnte, mit Ba(OH)₂ gekocht, der überschüssige

¹ Journal für praktische Chemie N. F. Bd. 20.

² Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 9, S. 7.

Baryt mit CO_2 ausgefällt, das Ganze filtrirt, das Filtrat eingedampft und verascht.

In der filtrirten salzsauren Lösung der Asche liess sich ziemlich viel Phosphorsäure, durch die Reactionen mit Magnesia-mixtur und mit molybdänsaurem Ammon nachweisen, woraus hervorgeht, dass in den Bacterien Lecithin enthalten ist. Der Niederschlag wurde mit HCl zerlegt, mit Äther ausgeschüttelt die ätherische Lösung alkalisch gemacht und mit Wasser ausgeschüttelt. Der Rückstand der ätherischen Lösung gab keine Cholestearinreaction. Aus der wässerigen Lösung konnte durch HCl das Gemenge der freien Fettsäuren in fester Form abgetrennt werden, welches bei 63° schmolz. Daraus geht hervor, dass das Fett der Tuberkelbacillen vorwiegend aus Tripalmitin und Tristearin besteht und nur wenig oder gar kein Triolein enthält.

Deralkoholische Extract der Bacillen hinterliess nach dem Verdunsten des Alkohols eine bräunliche, klebrige, gummiartige Masse, welche auf dem Platinblech mit lichter, russender Flamme verbrannte (ähnlich den Fetten), N enthielt, aber phosphor- und schwefelfrei war. Dieselbe wurde mit Wasser gekocht, wobei ein Theil in Lösung ging, filtrirt, und mit dem Filtrate wieder ein Thierversuch gemacht. Ein grosses Meerschweinchen, welchem $\frac{3}{4}$ der Lösung subcutan injicirt wurden, zeigte bald nachher leichte Zuckungen der oberen und unteren Extremitäten, und ging circa 30 Stunden nach der Injection zu Grunde. Da der Tod während der Nacht erfolgte, konnten leider keine Beobachtungen gemacht werden.

Der Rest der Lösung wurde einem kleinen Meerschweinchen injicirt. 48 Stunden nach der Injection konnten bei diesem Thierte ganz ähnliche Erscheinungen beobachtet werden, wie in dem oben beschriebenen Versuche, nur fehlten die Krämpfe der Kau- und Nackenmuskulatur. Drei Stunden nach dem Eintritte der Convulsionen ging das Thier unter Streckkrämpfen zu Grunde.

Aus diesen Beobachtungen scheint hervorzugehen, dass in dem Alkoholextracte der Tuberkelbacillen eine giftige Substanz enthalten ist. Da es mir jedoch nicht gelang, dieselbe rein darzustellen, so muss ich diese Angabe mit einiger Reserve vorbringen und einer genaueren Prüfung vorbehalten.

Die Bacillen hatten nach der Extraction mit Alkohol und Äther ihre Form noch behalten und liessen sich auch nach der

gebräuchlichen Methode (Carbolfuchsin, nachherige Differenzirung mit Salpetersäure) färben.

Der in Alkohol und Äther unlösliche Theil der Bacterien wurde mit 100 cm^3 1% Kalilauge übergossen, 10 Stunden in der Kälte stehen gelassen, hierauf eine Stunde auf dem Wasserbade erwärmt. Da die Flüssigkeit sich nicht filtriren liess, wurde durch wiederholtes Decantiren (im Ganzen mit circa 300 cm^3 destilirtem Wasser) das Lösliche von dem Unlöslichen getrennt.

Aus dem ersteren liess sich durch Sättigung mit schwefelsaurem Ammon der Eiweisskörper der Bacillen in Form eines flockigen Niederschlages abscheiden, welcher die Xanthoprotein-, Biuret- und die Millon'sche Reaction gab.

In dem in verdünnter Kalilauge unlöslichen Theile liessen sich bei mikroskopischer Untersuchung zahlreiche in ihrer Form nicht veränderte Bacterien auffinden, welche jedoch die obenerwähnte Farbenreaction mit Carbolfuchsin nicht mehr gaben und sich auch durch Methylenblau nicht färben liessen. Danach ist es also das Eiweiss der Bacillen, das den Farbstoff fixirt. Dieser unlösliche Rückstand wurde mit Hinsicht auf die interessante Entdeckung von Dr. Freund, dass in den Lungen tuberculös erkrankter Individuen Cellulose vorkomme, nach dieser Richtung untersucht. Zu diesem Zwecke wurde derselbe zunächst mit verdünnter Schwefelsäure gewaschen — das Waschwasser gab keine Reduction — und mit demselben dann folgende Reactionen vorgenommen:

1. Ein Theil wurde in concentrirter Schwefelsäure gelöst, die Lösung mit Wasser verdünnt und gekocht. Nach dem Kochen gab die Flüssigkeit mit alkalischer Kupfervitriollösung deutliche Reduction.

Zur Controle wurde ein Theil der Substanz mit Wasser gekocht, filtrirt, das Filtrat mit verdünnter Schwefelsäure gekocht und auf sein Reduktionsvermögen geprüft. Es zeigte sich keine Reduction.

2. Eine Portion wurde mit chlorsaurem Kali und Salpetersäure behandelt, wobei die Hauptmenge ungelöst blieb.

3. In Kupferoxydammoniak löste sich die Substanz theilweise auf, in der filtrirten Lösung erzeugte verdünnte Schwefelsäure eine leichte Trübung.

Auf Grund dieser Reactionen kann man behaupten, dass die Gerüstsubstanz der Tuberkelbacillen Cellulose sei. Der Umstand, dass die Reaction mit Kupferoxydammoniak kein sehr deutliches Resultat ergab, spricht nach meiner Ansicht nicht dagegen, da ja bekanntlich diese Reaction nur mit reiner Cellulose gut gelingt, während unreine Cellulose sich sehr schwierig in dem genannten Reagens löst. Ich möchte hier auch noch darauf hinweisen, dass nach Liebig die Cellulose der Hefezellen in Kupferoxydammoniak unlöslich ist, und die der Essigmutter (nach Nägeli¹) sich nur sehr langsam löst. Nimmt man an, dass der Stickstoff der entfetteten Bacterien nur in Form von Eiweiss darin enthalten ist, und setzt den Ngehalt des Eiweisses = 16%, so würden die Tuberkelbacillen bei einem Gehalt von 27% in Alkohol löslicher Stoffe und 8% Asche aus 36·9% Eiweiss und 28·1% Cellulose bestehen.

Betrachtet man die Resultate dieser Analysen, so ergibt sich, dass in den Tuberkelbacillen die meisten der gewöhnlich in Zellen vorkommenden Substanzen sich auffinden lassen. Sie unterscheiden sich aber von anderen Bacterien wesentlich durch die grosse Menge der durch Alkohol und Äther extrahirbaren Stoffe und durch das Vorkommen eines Krampfgiftes in der getrockneten Leibessubstanz. Die Cellulose kann man wohl nicht als einen charakteristischen Bestandtheil der Tuberkelbacillen betrachten, da dieselbe auch in einigen anderen Spaltpilzarten (*Mycoderma aceti*, *Leuconostox*) aufgefunden worden ist. Detaillirtere Untersuchungen über die Verbreitung der Cellulose bei verschiedenen Bacterienarten fehlen jedoch noch.

Obwohl die Zahl der Spaltpilzarten, deren Leibessubstanz analysirt worden ist, noch eine geringe ist, so beweisen die bis jetzt vorliegenden Resultate doch schon, dass die verschiedenen Bacterienarten in ihrer chemischen Zusammensetzung bedeutende Differenzen aufweisen und speciell die Differenzen im Stickstoffgehalte der entfetteten Zellen zeigen deutlich, dass das Verhältniss der Eiweisskörper zu den stickstofffreien Substanzen (Kohlehydraten?) in der Leibessubstanz der Bacterien grossen Schwankungen unterliegt. Diese Unterschiede in der chemischen

¹ Journal für prakt. Chemie N. F. Bd. 17.

Zusammensetzung verschiedener Spaltpilzarten kann man wohl als einen neuen Beweis für die Constanz der Arten betrachten.

Die Untersuchung der Stoffwechselproducte ergab kein Resultat. Bei dem langsamen Wachstum der Tuberkelbacillen war es von vornherein unwahrscheinlich, dass ihr Stoffwechsel ein lebhafter sein werde. Der erwähnte Geruch der Culturen rührte, wie die Untersuchung des Destillates der mit Oxalsäure angesäuerten Nährsubstanzen¹ ergab, von einem Alkohol her (Jodoformreaction, Bildung von Aldehyd bei Oxydation, Bildung von Benzoesäureester), der jedoch nicht Äthylalkohol war. Nach dem Ansäuern mit H_2SO_4 wurden die Lösungen mit Äther ausgeschüttelt. In dem ätherischen Extracte liess sich keine Milchsäure nachweisen. Die wässerigen Lösungen wurden nach den Methoden von Brieger zum Nachweis der Ptomaine verarbeitet. Einige Extracte zeigten zwar toxische Wirkung, ein krystallisirter Körper liess sich jedoch (aus circa 10 l Nährsubstanzen) nicht darstellen.

Es erübrigt mir nur noch, meinem verehrten Lehrer Herrn Professor Nencki für die Anregung zu dieser Arbeit und für die Unterstützung, welche er mir im ganzen Verlaufe derselben zu Theil werden liess, meinen wärmsten Dank anzusprechen.

¹ Zu dieser Untersuchung wurden nur die Bouillon- und Agarculturen verwendet, die Hefelösungen jedoch ausgeschlossen.
