

# D I E C H E M I E

(Angewandte Chemie, Neue Folge) 58. Jahrgang, Nr. 1/2 u. 3/4, Seiten 1–24, Januar 1945.

## Symbiose und Antibiose\*)

Von Dozent Dr. K. WALLENFELS

Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizinische  
Forschung, Heidelberg, Institut für Biologie

### Einleitung.

Das Zusammenleben verschiedenartiger Organismen ist für die Natur von größter Bedeutung. Nicht einmal die „autotrophen“ Pflanzen könnten auf die Dauer unabhängig von anderen leben, weil es ihnen bald an der Kohlensäure mangeln würde, die sie zum Aufbau ihrer Zellsubstanz benötigen. Diese Kohlensäure liefert ihnen der Stoffwechsel der Tiere und vieler anderer Lebewesen, welche bei ihrem Wachstum die von den Pflanzen synthetisierten Kohlenhydrate und andere organische Verbindungen zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  abbauen. Dazu brauchen diese wiederum den Sauerstoff, welcher von den Pflanzen gebildet wird. Dieses wechselseitige Geben und Nehmen der Stoffwechselprodukte  $\text{CO}_2$  und  $\text{O}_2$  zwischen den beiden großen Gruppen der Organismen stellt die Grundlage des Lebens auf der Erde dar und ist zugleich die großartigste Symbiose, die wir kennen.

So betrachtet ist alles Leben ein Leben in Gesellschaft, und es würde den Rahmen dieser Betrachtung bei weitem sprengen, wollte man diese Erscheinung auch nur annähernd in ihrer Bedeutung und Reichweite kennzeichnen. Die wenigen in ihrer stofflichen Natur heute wirklich überblickbaren Symbiosen kommen im Reich der Mikroorganismen vor, so daß sich dieser Bericht im wesentlichen mit dem Leben von Mikroorganismen befaßt.

### I. Symbiose.

#### a) Symbiosen zwischen Mikroorganismen.

Unter den natürlichen Bedingungen begegnet man in den seltensten Fällen reinen Kulturen eines einzigen Lebewesens. Fast stets handelt es sich um gemischte Kulturen. Nur in den wenigsten Fällen wird es gelingen, die verschiedenartigen Organismen, die in der Natur zusammenleben, einzeln auf demselben Nährboden zu züchten, auf dem sie in gemischter Kultur zu wachsen vermögen. Zwischen diesen in der Natur zusammenlebenden Einzellern bestehen nämlich meist definierte stoffliche Beziehungen. Sie beliefern einander mit Stoffen, die für ihre Ernährung von Wichtigkeit sind. Die Ernährungsphysiologie der Mikroorganismen<sup>1,2,3,4)</sup> hat gezeigt, daß Bakterien, Pilze, Hefen und Protozoen z. T. ebenso große Anforderungen an das Nährmedium stellen, wie die höheren Tiere und der Mensch. Doch ist ihr Bedürfnis an Vitaminen sehr verschieden. Sie können sich daher häufig gegenseitig ergänzen und in ihrem Wachstum fördern. Ein Wuchsstoff, den der eine Organismus nicht synthetisieren kann, wird ihm von einem anderen, der dazu imstande ist, geliefert. Manche Organismen bedürfen der Zufuhr einer ganzen Anzahl von Wuchsstoffen, manchen fehlt nur die Fähigkeit zur Synthese eines einzigen<sup>5,6)</sup>. Für die rote Hefe *Rhodotorula rubra* ist Aneurin ein Wuchsstoff. Es zeigte sich, daß sie aber nicht die ganze Aneurin-Molekel benötigt, sondern nur die Pyrimidin-Komponente. Der Pilz *Mucor ramanianus* spricht ebenfalls auf Aneurin an, vermag aber zu wachsen, wenn man ihm die Thiazol-Komponente des Aneurins zuführt. Läßt man diese beiden Pilze in Gesellschaft wachsen, so produziert der eine für den anderen die ihm fehlende Komponente des Vitamins, und sie gedeihen ohne Zusatz von Aneurin oder einer der beiden Hälften der Molekel<sup>8)</sup>. Manchen Organismen muß man

Inhalt: Einleitung — I. Symbiose: a) Symbiosen zwischen Mikroorganismen; Commensalismus und Synergismus; b) Symbiosen zwischen Mikroorganismen und höheren Pflanzen; c) Symbiosen von Mikroorganismen mit Tieren — II. Antibiosen: Die Erscheinung der Antibiose; a) die Antibiose der niederen Pilze; Actinomyceten — Aspergillusarten — Penicillien; Wasserstoffperoxyd (Glucoseoxydase); die Chinone als Hemmstoffe; Salicylsäure; Lactone; b) Antibiose der Bakterien; Chromobakterien; Aerobe Sporenbildner: Mesentericus, Mycoides, Subtilis, B. Brevis (Gramicidin, Tyrocidin); c) die Bedeutung der Antibiose für das Leben der Pflanzen; d) die Bedeutung für Tiere und Menschen.

beide Komponenten geben, damit sie das Vitamin aufbauen können. Da auch die chemische Aneurin-Synthese über die beiden Stufen verläuft, wurde von H. Fink<sup>9)</sup> vorgeschlagen, die Hefe *Torula utilis* zur technischen Synthese zu benutzen.

### Commensalismus und Synergismus.

Ein wichtiger Grund, warum verschiedene Mikroorganismen nur in Gesellschaft auf bestimmten Nährböden vorkommen, ist der „Commensalismus“. Eine bestimmte Nahrung kann nur gemeinsam verwertet werden, weil eine Art allein nicht über die notwendigen Fermente verfügt, um den Abbau durchzuführen. Sie wird von manchen Autoren daher auch als „Synergismus“ bezeichnet<sup>10)</sup>. P. Vuillemin<sup>11)</sup> betrachtete die Beziehungen, die zwischen dem Pilz *Mucor rouxianus* und einem *Mikrococcus* bestehen, als Commensalismus. Der *Mikrococcus* wächst allein nicht auf Kartoffeln, wohl aber in Gegenwart des *Amylomyceten*, welcher Maltose produziert, welche vom *Mikrococcus* verwertet werden kann. In diesem Falle wird der *Mikrococcus* tief orange pigmentiert. S. A. Waksman u. S. Lomanitz<sup>12)</sup> fanden, daß *Bacillus cereus* gut auf Casein-Medium wächst, während *Pseudomonas fluorescens* dieses Substrat nicht verwerten kann. In gemischter Kultur entwickelt sich kräftiges Wachstum der *Fluorescens*-Bakterien, da der *Cereus* offenbar Abbauprodukte des Caseins liefert, die von ihnen leicht verwertet werden können. W. L. Holman<sup>13)</sup> möchte mit dem Wort Synergismus jenen Typ von Commensalismus bezeichnen, bei welchem zwei oder mehrere Organismen, die zusammen wachsen, eine Umsetzung hervorbringen, die von keinem allein bewirkt werden kann. So berichtete schon 1892 M. v. Nencki<sup>14)</sup>, daß eine gemischte Kultur von *Bacillus paralatici* und *Clostridium chauvoei* Butylalkohol aus Glucose bildet, obwohl keiner der beiden Organismen allein dazu imstande ist. W. L. Holman u. D. M. Meekison<sup>15)</sup> haben eine Reihe von Organismenpaaren identifiziert, die aus Kohlenhydraten oder höheren Alkoholen Gas produzieren, von denen ein Partner allein diese Umsetzung jedoch nicht bewirkt.

Organismus	Gasbildung mit	
	Mannit	Maltose
<i>Shiga</i> .....	0	0
<i>Flexner</i> .....	0	0
<i>Y.</i> .....	0	0
<i>Bact. morganii</i> .....	0	0
<i>Shiga</i> + <i>B. morganii</i> .....	0	+
<i>Flexner</i> + <i>B. morganii</i> .....	+	+
<i>Y</i> + <i>B. morganii</i> .....	+	0

Manche saccharolytischen Organismen können die Proteine der Milch nicht angreifen. Für sie sind nur dann genügend Stickstoff-Verbindungen erreichbar, wenn gleichzeitig proteolytisch aktive Bakterien anwesend sind<sup>16)</sup>. *B. coli* und *Proteus vulgaris* wachsen nur g e m e i n s a m auf Lactose-Harnstoff-Nährböden. Der eine der beiden spaltet den Harnstoff, kann aber Lactose nicht fermentieren, der andere, der Lactose fermentiert, besitzt keine Urease, um den Harnstoff zu spalten<sup>17)</sup>. — Die Propionsäure-Bildung aus Lactose durch *Bacillus acidi propionici* wird stark erhöht durch die Anwesenheit von Milchsäure-Cocci oder -Bacillen<sup>18)</sup>. Hierbei wird die Propionsäure nicht direkt aus der Milchsäure gebildet, sondern offenbar aus einem Zwischenprodukt der Milchsäure-

\*) Auszugsweise vorgetragen bei der Münchner Vortragsveranstaltung des VDCh am 16. Oktober 1943.

<sup>1)</sup> B. C. J. G. Knigh, Med. Res. Council, Special Repts. Ser. No. 210 [1938].

<sup>2)</sup> W. H. Schopfer, Ergebn. Biol. 16 [1939].

<sup>3)</sup> E. F. Moeller, diese Ztschr. 53, 204 [1940].

<sup>4)</sup> A. Lwoff: Recherches biochimiques sur la nutrition des protozoaires. Paris 1932.

<sup>5)</sup> W. H. Schopfer, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 200, 1965 [1935].

<sup>6)</sup> E. E. Snell u. L. D. Wright, J. biol. Chemistry 139, 675 [1941].

<sup>7)</sup> E. C. Barton-Wright u. R. G. Booth, Biochemic. J. 37, 25 [1943].

<sup>8)</sup> W. F. Müller u. W. H. Schopfer, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 205, 687 [1937]; W. H. Schopfer ebenda 205, 445 [1937].

<sup>9)</sup> H. Fink, F. Just u. A. Hock, Ber. dtsch. chem. Ges. 75, 2101 [1942].

<sup>10)</sup> H. Kämmerer, Klin. Wschr. 2, 1153 [1923]; 3, 723 [1924].

<sup>11)</sup> C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 134, 366 [1902].

<sup>12)</sup> J. agric. Res. 30, 263 [1925].

<sup>13)</sup> Bacterial associations in Jordan u. Falck: The newer knowledge of Bacteriology and Immunology, Chicago 1929.

<sup>14)</sup> Zbl. Bakteriell., Parasitenkunde Infektionskrankh. 11, 225 [1892].

<sup>15)</sup> J. infect. Diseases 39, 145 [1926].

<sup>16)</sup> M. Ishikawa, ebenda 41, 238 [1927].

<sup>17)</sup> M. Ishikawa, ebenda 43, 67 [1928].

<sup>18)</sup> I. M. Sherman u. R. H. Shaw, J. biol. Chemistry 56, 695 [1923]; J. gen. Physiol. 3, 657 [1921].

Fermentation. — Auch eine völlige Umstellung der Fermentation eines Organismus durch die Anwesenheit eines anderen kommt vor. Schon im ersten Weltkrieg wurden in den USA. aus den reichlich zur Verfügung stehenden pflanzlichen Kohlenhydraten große Mengen Butylalkohol und Aceton durch Gärung mit dem *Bacillus granulobacter pectinovorum* gewonnen. Ernste Schwierigkeiten traten ein, als die Kulturen mit dem aeroben *Bacillus volutans* verunreinigt wurden. Die Aceton-Ausbeute fiel als Folge der gemischten Kultur stark ab, und es entstand vorwiegend Milchsäure. Die Verunreinigung mit *Bacillus volutans* hatte die Aceton-Butylalkohol-Gärung in eine Milchsäure-Gärung umgeformt<sup>19)</sup>. — Zahlreich sind die Beispiele dafür, daß das Wachstum eines Anaerobiers auch unter aeroben Bedingungen ermöglicht wird, wenn ein ausgesprochener Aerobier zugegen ist<sup>20,21)</sup>. *S. Winogradsky*<sup>22)</sup> und *V. L. Omeliansky*<sup>23)</sup> stellten fest, daß in den oberflächlichen Schichten des Bodens zahlreiche Organismen den Sauerstoff verbrauchen und anaerobe Bedingungen für den stickstoff-bindenden Anaerobier *B. clostridium pasteurianum* herstellen. Einige der Aerobier liefern aber auch dem Anaerobier Kohlenstoff-Verbindungen. Der aerobe ebenfalls stickstoff-bindende Azotobakter andererseits, der alkalisch ist, verbraucht saure Produkte des Anaerobiers, wie z. B. Buttersäure. So arbeiten im Boden die beiden stickstoff-bindenden Organismen gut zusammen. Ähnliche Synergismen sind auch in der Bakterienflora offener Wunden anzunehmen. Dies wurde schon im ersten Weltkrieg bei Verwundungen beobachtet<sup>24,25)</sup>. Wundinfektionen, die den Anschein rein anaeroben Ursprungs haben, können doch durch *B. proteus* und *B. pyocyaneus* wesentlich mitverursacht sein, da diese die Virulenz von *B. perfringens* und *V. septique* erheblich steigerten und deren Wachstum förderten. Auch in aeroben Oberflächenkulturen aus Weltkriegswunden wuchsen gemischt Anaerobier und Aerobier.

## b) Symbiosen zwischen Mikroorganismen und höheren Pflanzen.

Nicht nur zwischen den Mikroorganismen untereinander gibt es stoffliche Beziehungen, sie bestehen auch zwischen ihnen und den höheren Organismen, den Pflanzen und Tieren, mit denen sie zusammen leben. Dies Zusammenleben kann sehr verschieden eng sein. Es kann ein „Nebeneinander“ sein, wie es z. B. in den verschiedenen Pflanzengesellschaften vorkommt, wobei jedoch kein definierter gegenseitiger Einfluß auf das Wachstum besteht. Man hat vorgeschlagen, für diese Erscheinung den Namen „Parabiose“ zu gebrauchen und sie scharf zu trennen von den eigentlichen Symbiosen, wo ein enges körperliches Zusammenleben, ein Leben des einen Partners im Körper des andern oder sogar in den Zellen des andern stattfindet<sup>26)</sup>. Derartige Symbiosen finden sich bei den Leguminosen, wo die symbiontischen Bakterien in die Wurzelhaare eindringen und dort den Wirtsorganismus zu verstärkten Zellteilungen anregen. Die neu entstandenen Zellen vergrößern sich besonders stark, und es entstehen die sog. Knöllchen. Hier findet also ein Gestaltswandel des Wirtes unter dem Einfluß der Symbionten statt. Die Hülsenfrüchtler können auf praktisch stickstoff-freien Böden wachsen und trotzdem in ihren Samen besonders große Mengen von Protein ablagern, weil die Knöllchenbakterien den Luft-Stickstoff assimilieren und in Zellprotein überführen, d. h. damit zu wachsen vermögen. Wenn die Bakterienkolonien aber eine gewisse Größe erreicht haben, werden sie vom Wirtsorganismus verdaut, der auf diesem Umweg den Stickstoff der Luft verwertet, was die höhere Pflanze allein nicht kann.

Andere bakterielle Symbiosen finden sich bei einigen tropischen Pflanzen, die zu den *Rubiaceen* und *Myrsinaceen* gehören. Hier leben die Symbionten in den Blättern, wo sie ebenfalls besondere Knötchen bilden. Auch hier sind die Symbionten von Bedeutung für das Wachstum des Wirtes. Es ist aber noch nicht völlig geklärt, wie weit es sich um Lieferung von für die Pflanze assimilierbarem Stickstoff oder auch um die Abgabe von spezielleren Stoffen handelt, die den Wuchs beeinflussen.

Sehr weit verbreitet ist die Symbiose zwischen Pilzen und Pflanzen. Sie findet sich vor allem bei unseren Waldbäumen, bei welchen die Wurzeln von einem dichten Fadengeflecht bestimmter Pilze umgeben sind. Diese Erscheinung nennt man Mykorrhiza, d. h. Pilzwurzel. Besonderes Interesse hat die Mykorrhiza der Orchideen gefunden. Die Orchideensamen sind ausgezeichnet durch ihre ungewöhnliche Kleinheit. Ein Samenkorn von *Schomburgkia undulata* wiegt nur 0,3 γ. Für den Aufbau des Keimlings stehen also nur sehr unbedeutende Mengen an Reservematerial zur Verfügung. Damit die Orchideensamen keimen, müssen zuvor die Hyphen der Mykorrhizapilze in den Samen eingedrungen sein. Sie bilden darin einen Knäuel und werden schließlich vom Keimling verdaut. Wie *H. Burgeff*<sup>27)</sup> zeigen konnte, gelingt es auch, die Samen pilzfrei zum Keimen zu bringen, jedoch nur, wenn man zum Nährsubstrat Extrakte aus Symbiosepilzen oder anderen Pilzen, aus Hefe oder Phycomyces zufügt. Um welche bestimmten Faktoren es sich handelt, die der Symbiont seinem „Wirt“ liefert, damit die Keimung möglich ist, konnte noch nicht ermittelt werden. Doch dürfte der Orchideensamen ein günstiges Objekt zum Studium des Wuchsstoffbedürfnisses der höheren Pflanze sein.

Auf Einzelfragen der verschiedenen pflanzlichen Symbiosen sowie auf die Symbiosen mit Actinomyceten, Blaualgen, auf Flechten und die Pilzsymbiosen der Loliumarten genauer einzugehen, verbietet die Beschränktheit des Raumes. Der an diesen Fragen Interessierte sei auf die vor kurzem erschienene Monographie von *Schaede*<sup>28)</sup> verwiesen.

## c) Symbiosen von Mikroorganismen mit Tieren.

Auch aus diesem sehr umfangreichen Gebiet können nur wenige Beispiele herausgegriffen werden. Die Bedeutung dieser Symbiosen für den tierischen Organismus ist erst in wenigen Fällen klar erkannt. Einmal sind es jene Symbiosen, die einem einfachen Zweck dienen, wie die Leuchtsymbiosen bei gewissen Meerestieren, wo die mit Leuchtbakterien gefüllten Organe in der Nähe der Mundöffnung angebracht sind und der Anlockung von Beutetieren dienen oder in der Umgebung der Augen, um besseres Sehen in großer Tiefe und bei Nacht zu ermöglichen. Hier liegt der Zweck der Symbiosen klar auf der Hand. Ebenso bei einigen ausschließlichen Holzfressern, bei welchen nachgewiesen werden konnte, daß die symbiontischen Bakterien Cellulasen produzieren, welche dem Wirt zur Verdauung seiner Nahrung dienen<sup>29)</sup>.

Die Annahme, daß der Symbiose bei den Insekten eine viel allgemeinere Bedeutung zukommt, wurde von *Buchner* schon sehr frühzeitig vertreten, als er erkannte, wie komplizierte Mechanismen häufig dazu dienen, um eine Übertragung der Symbionten auf die Nachkommenschaft zu sichern<sup>30)</sup>. Tatsächlich zeigte es sich, als man versuchte, künstlich symbiontenfrei gemachte Eier steril aufzuziehen, daß sie sich häufig gar nicht oder zu Kümmerformen entwickelten. *Koch*<sup>30)</sup> konnte 1933 bei dem Brotkäfer *Sitodrepa* zeigen, daß das Zufügen von Hefeextrakt zur Nahrung diese Mangelerscheinungen weitgehend behebt. Er sprach auch bereits die Vermutung aus, daß die Bedeutung der Symbionten für den Wirt in der Lieferung von Vitaminen der B-Gruppe liegt. Es fehlte aber bisher eine genaue Analyse des Vitaminbedarfs derartiger Insekten auf Grund der modernen Erkenntnisse der Wuchsstoffforschung. Vor kurzem haben *G. Fraenkel* u. *M. Blevett*<sup>31)</sup> eine solche Bestimmung bei *Lasioderma* und *Sitodrepa* gemacht (Tab. 1).

Die volle Diät bestand aus: 50 Teile Casein; 50 Teile Glucose; 1 Teil Cholesterin; 5 Teile „unlöslicher Anteil von

	Lasioderma		Sitodrepa	
	unsterilisiert	sterilisiert	unsterilisiert	sterilisiert
volle Diät .....	++++	+++	++++	++++
kein B <sub>1</sub> .....	++	—	—	—
kein B <sub>2</sub> .....	++++	—	++(+)	—
keine Nicotinsäure .....	++++	—	++++	—
kein B <sub>6</sub> .....	++++	—	+++	—
keine Pantothensäure .....	+++	—	++	—
kein Cholinchlorid .....	++	—	++	+
kein Inosit .....	++++	+++	++++	++++
keine p-Amino-benzoesäure ..	++++	+++	++++	++++

Tabelle 1.

(Das Wachstum mit voller Diät wird mit ++++ bezeichnet.)

<sup>19)</sup> H. B. Speakman u. J. F. Phillips, J. Bacteriol. 9, 183 [1924].

<sup>20)</sup> F. G. Novy, Z. Hyg. Infekt.-Krankh. 17, 209 [1894].

<sup>21)</sup> E. G. Pringsheim, Zbl. Bakt., Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. II 51, 72 [1920].

<sup>22)</sup> C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 118, 353 [1894].

<sup>23)</sup> Arch. Sci. biol. 18, 1 [1915].

<sup>24)</sup> M. Weinberg u. J. Olesko, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées 84, 535 [1921].

<sup>25)</sup> M. Weinberg, ebenda 88, 286 [1915].

<sup>26)</sup> R. Schaede: Die pflanzlichen Symbiosen, Jena 1943.

<sup>27)</sup> Die Samenkeimung der Orchideen, Jena 1936.

<sup>28)</sup> L. R. Cleveland, Biol. Bull. Mar. Biol. Labor. Wood's Hole 48, 282 [1925]; E. Werner, Z. Morph. Ökol. Tiere 6, 150 [1926].

<sup>29)</sup> P. Buchner: Tier und Pflanze in Symbiose, Berlin 1930.

<sup>30)</sup> Biol. Zbl. 53, 199 [1933]; Naturwiss. 21, 543 [1933].

<sup>31)</sup> Nature [London] 152, 506 [1943]; 151, 703 [1943].

Hefe“; 2 Teile *McCollums* Salzmischung; 15 Teile Wasser; 7 Teile Weizenkeimöl; Aneurin, Lactoflavin, Nicotinsäure, Adermin, Pantothenensäure und p-Amino-benzoesäure je 50  $\gamma$ /g trockene Diät; Cholinchlorid und Inosit je 500  $\gamma$ /g Diät.

Es zeigte sich, wie aus Tab. 1 hervorgeht, daß normale symbiontenträgende Larven und symbiontenfreie Larven sehr verschiedene Vitaminbedürfnisse haben. In Abwesenheit der 5 wichtigen B-Faktoren Aneurin, Lactoflavin, Nicotinsäure, Adermin und Pantothenensäure findet gar kein Wachstum statt, bei Abwesenheit von Cholin nur bei *Sitodrepa* sehr geringes Wachstum. Inosit und p-Amino-benzoesäure sind entweder noch in der Grunddiät in genügender Menge enthalten, oder sie werden von den Insekten nicht benötigt.

Da die meisten Symbiosen bei Insekten vorkommen, die sich durch besonders einseitige Ernährungsweise auszeichnen, wie bei Pflanzensäftesaugern, Blutsaugern, Holz- und Cerealienfressern, ist anzunehmen, daß ihre Bedeutung allgemein in der Lieferung von Vitaminen besteht. Doch muß betont werden, daß es hier auch Ausnahmen gibt, da *A. Koch*<sup>32)</sup> zeigen konnte, daß der Reiskäfer *Oryzaephilus surinamensis* sich aus sterilen Eiern ebensogut entwickelt wie aus symbiontenthaltigen.

Aber auch umgekehrt ist der Wirt von großem Einfluß auf das Wachstum seiner Symbionten, insbes. auf deren Gestalt. Hierüber hat *H. J. Müller*<sup>33)</sup> in einer eingehenden Arbeit berichtet. Bei 186 verschiedenen Fulgoroiden (*Homoptera cicadina*) wies er 25 verschiedene Symbiontenarten nach. Jede Fulgoroide beherbergte 1 oder mehrere bis zu 5 Organismenarten. Diese liegen in sehr verschiedenen Formen vor, je nachdem, ob sie Männchen oder Weibchen bewohnen. Es kommt bei den Weibchen zur Ausbildung bestimmter Infektionsformen, durch welche die Symbionten auf die Eier und die Nachkommenschaft übertragen werden. Beim Männchen aber unterbleibt die Ausbildung der Übertragungsformen. Die Teilungsrate der Symbionten geht stark zurück, sie verlieren ihre ursprüngliche Form, es kommt zu Riesenwuchs und Pleomorphismus. Auch bei den weiblichen Fulgoroiden entwickeln sich derartige Riesenformen in bestimmten Organen, zerfallen aber in viele kleine „Wandersymbionten“, wenn sie in den Bereich einer bestimmten Mitteldarmschlinge kommen. Welche Stofflichen Einflüsse es sind, die vom Wirt ausgehen und die Gestalt der symbiontischen Mikroorganismen derartig weitgehend bestimmen, ist noch nicht untersucht worden.

Auch die höheren Tiere beherbergen Symbionten, die für ihr Leben von großer Bedeutung sind. Das höhere Tier vermag bekanntlich Harnstoff nicht weiterzuverarbeiten. Dieser ist vielmehr die wichtigste Form, in welcher Stickstoff aus dem Stoffwechsel des Säugetieres ausgeschieden wird. Trotzdem vermögen Wiederkäuer gut zu wachsen und Milch zu produzieren, wenn ein erheblicher Teil des Stickstoffes der Nahrung in Form von Harnstoff zugeführt wird. Es konnte nachgewiesen werden, daß es auch hier zunächst Mikroorganismen sind, welche den Harnstoff in Ammoniak spalten und dieses in ihr Zellprotein, das dann dem Tier als Nahrung dient, überführen. Die Bakterien aus dem Pansen der Tiere können nämlich *in vitro* mit dem Harnstoff als alleiniger Stickstoff-Quelle wachsen. Wenn man 1500 cm<sup>3</sup> Panseninhalt mit 0,65 g Harnstoff und 7,5 g Stärke und den üblichen Salzen bebrütete, so wurden in den ersten 3 h 9 mg N/100 cm<sup>3</sup> Panseninhalt in Protein übergeführt. Wenn man den Inhalt eines Pansens mit 75 kg berechnet, so bedeutet dies eine Produktion von 54 g Protein-N/Tag oder 375 g Protein. Dies sind etwa 25% des Total-Proteinbedarfs einer Kuh mit 10 l täglicher Milchleistung<sup>34)</sup>.

Aber nicht nur der Nutzbarmachung von Stickstoff-Verbindungen, die normalerweise vom höheren Tier nicht verwertet werden können, dienen die Pansensymbionten der Wiederkäuer. Von *J. Pochon*<sup>35)</sup> ist aus dem Rinderpansen ein Bakterium isoliert worden, welches Cellulose fermentiert, d. h. als Kohlenstoff-Quelle benutzt. Kultiviert man dieses *Plectridium cellulolyticum* *in vitro* mit reinem Filtrierpapier als Kohlenstoff-Quelle, so findet man in jungen Gäransätzen 80% der Cellulose als Carbonsäuren wieder, davon 73% als Ameisensäure und 27% als Essigsäure. Am Ende der Fermentation treten 6% Propionsäure auf. Daneben werden 5,4% des Ge-

wichtes der Cellulose als Äthylalkohol wiedergefunden<sup>36)</sup>. Diese Fermentation ist völlig analog derjenigen, die im Pansen des Tieres stattfindet<sup>37)</sup>. Fügt man auf dem Höhepunkt der Fermentation Toluol zum Gäransatz, so daß die Bakterien getötet werden, so wird eine Cellulase ausgeschieden. Man erhält dann 10% der Cellulose als Glucose. Einerseits stellt also die Cellulose, die von den Wiederkäuern gefressen wird, ein Nährsubstrat für die Bakterien des Pansens dar, andererseits wird mit Hilfe der von den Bakterien produzierten Cellulase die Cellulose in Glucose, also eine auch vom Tier verwertbare Verbindung, umgewandelt. Das Verhältnis Tier—Bakterien stellt also eine Symbiose dar, aus der beide Partner einen wesentlichen Nutzen ziehen.

Eine interessante Symbiose, die jedoch noch nicht völlig aufgeklärt erscheint, ist diejenige der Stickstoff assimilierenden X-Bakterien im Blute des Blauwals. Diese wurden von *H. Laurie*<sup>38)</sup> entdeckt. Er schrieb ihnen eine Bedeutung bei der Entfernung des Stickstoffs aus dem Blute zu, das sich stark mit Stickstoff anreichert, wenn das Tier nach dem Atemholen in größere Wassertiefen geht und der Sauerstoff durch den Stoffwechsel verbraucht wird. *A. Krogh*<sup>39)</sup> zieht diese Erklärung aber in Zweifel, da die Bakterien zum Wachstum ja mindestens ebensoviel Sauerstoff wie Stickstoff verbrauchten und so das Verhältnis Sauerstoff/Stickstoff nicht wesentlich verschieben könnten.

Ebensowenig wie die meisten symbiontenträgenden Insekten unter sterilen Bedingungen sich entwickeln oder die Wiederkäuer ohne die Pansensymbionten Cellulose verdauen könnten, ebensowenig könnten die Säugetiere und der Mensch steril, ohne die symbiontischen Organismen des Darms, existieren. Es ist nicht möglich im Rahmen dieser Abhandlung die symbiontischen Leistungen der Darmflora für den höheren Organismus ausführlich zu schildern. *T. Baumgärtel* hat vor kurzem die enteralen Biosynthesen durch *B. coli* eingehend dargestellt<sup>40)</sup>.

## II. Antibiosen.

Fast ebenso zahlreich wie die Berichte darüber, daß Organismen, die in Gesellschaft sehr gut zu wachsen vermögen, dies nicht mehr können, sobald man sie einzeln auf dem gleichen Nährboden kultiviert, sind die Angaben über Fälle, wo das Umgekehrte zutrifft: Verschiedene Organismenarten, die einzeln auf einem gegebenen Substrat gut gedeihen, gehen zugrunde, wenn man sie zusammen kultiviert. Sehr eindrucksvoll ist das Bild bei folgendem Versuch: Man beimpft eine Agarplatte mit zwei Strichen von *B. subtilis* und impft dazwischen einen Strich von *Ps. fluorescens*. Man sieht nach einigen Tagen, daß die beiden Bakterienarten nicht zusammen wachsen können, sondern überall, wo *Fluorescens* wächst, geht *Subtilis* zugrunde. Darüber hinaus ist die *Fluorescens*-kultur von einer Hemmungszone umgeben, innerhalb der ebenfalls keine *Subtilis*-Bakterien angehen. Die Größe dieser Hemmungszone ist verschieden, je nachdem, welche Organismen man an Stelle von *Subtilis* als Testorganismen nimmt<sup>41)</sup>. Der Grund für diese Erscheinung ist entweder der, daß der eingimpfte Organismus dem Nährmedium Stoffe entzieht, die für das Wachstum des anderen lebenswichtig sind, oder aber der, daß er Stoffe produziert und an das Nährmedium abgibt, die dem Wachstum des anderen hinderlich sind. In diesem Falle kann man auch häufig beobachten, daß es nicht gelingt, einen Organismus in frischem Nährmedium zu züchten, wenn man sterile, gebrauchte Kulturlösung eines anderen zufügt.

Die ersten Fälle dieser Erscheinung wurden schon 1877 von *L. Pasteur*<sup>42)</sup> und 1879 von *De Bary*<sup>43)</sup> beschrieben. *M. Ward*<sup>44)</sup> nannte sie 1899 Antibiose. Derartige Antagonismen oder Antibiosen kennen wir bei sämtlichen Arten von Mikroorganismen. Pilze hemmen das Wachstum von Bakterien und umgekehrt, Bakterien bekämpfen Bakterien, Protozoen vertilgen Bakterien, und manche Bakterien sind giftig für Protozoen. Die antibiotischen Stoffe sind die Mittel, welche die Mikroorganismen im Kampf ums Dasein anwenden. Sie sind wahrscheinlich von großer Bedeutung überall dort, wo es sich darum handelt, bestimmte Populationen von Mikroorganismen aufrechtzuerhalten, wie im Darm der Säugetiere und der Menschen, im Pansen der Wiederkäuer und im Boden.

<sup>32)</sup> Z. Morph. Ökol. Tiere 32, 137 [1936].

<sup>33)</sup> Zoologica 36, H. 98 Lfg. 1 u. 2 [1940].

<sup>34)</sup> R. M. Pearson u. J. A. B. Smith, Biochem. J. 37, 142, 148, 153 [1943].

<sup>35)</sup> C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées 113, 1323 [1933].

<sup>36)</sup> Ebenda 114, 327 [1934].

<sup>37)</sup> C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 199, 983 [1934].

<sup>38)</sup> Discovery 7, 363 [1933].

<sup>39)</sup> Nature [London] 133, 635 [1934].

<sup>40)</sup> Klin. Wschr. 21, 265 [1942].

<sup>41)</sup> J. M. Lewis, J. Bacteriol. 17, 89 [1928].

<sup>42)</sup> Oeuvres de Pasteur, Paris 1922.

<sup>43)</sup> Die Erscheinung der Symbiose, Straßburg 1879.

<sup>44)</sup> Ann. Botany 549 [1899].

Erst in jüngster Zeit beginnt man, sich in weiteren Kreisen für diese natürlichen Hemmstoffe des Wachstums zu interessieren. Sie übertreffen z. T. die wirksamsten synthetischen Chemotherapeutika, die man kennt, um mehrere Zehnerpotenzen.

Manche Pilze und Bakterien produzieren bestimmte Stoffe in so großer Menge, daß davon das Nährmedium so weitgehend geändert wird, daß andere Organismen nicht mehr darin zu wachsen vermögen. Milchsäure, Citronensäure und Alkohol sind nur schwach baktericid und wenig bakteriostatisch; hochprozentige Lösungen davon, wie sie durch die entsprechenden Pilze hergestellt werden, sind aber nur für wenige Organismen als Nährsubstrat geeignet. Oft ist auch nur die Veränderung im pH der Nährlösung die Ursache dafür. Biologisch und chemotherapeutisch interessanter sind aber solche Stoffwechselprodukte, die schon in sehr geringer Konzentration das Wachstum anderer Organismen verhindern. Einige dieser Stoffe wurden schon in reiner Form gewonnen und ihre Wirksamkeit genau bestimmt. Die Mehrzahl der bisher beschriebenen Effekte dieser Art ist jedoch in ihrer stofflichen Natur noch unaufgeklärt. Sie stellen für Biologen, Chemiker und Ärzte noch ein weites Arbeitsfeld dar. Beobachtungen dieser Art finden sich in der biologischen, botanischen, physiologischen, chemischen und landwirtschaftlichen Literatur weit verstreut, und alle bisher erschienenen, uns z. Zt. zugänglichen Zusammenfassungen über dieses Thema<sup>45-49)</sup> können noch nicht als vollständig angesehen werden. Auch diese Darstellung erhebt nicht diesen Anspruch, sondern möchte nur die wichtigsten und gesichertsten antagonistischen Effekte kritisch sichten.

#### a) Die Antibiose der niederen Pilze.

##### Actinomyceten.

Den im Boden vorkommenden Actinomyceten wird eine wichtige Rolle bei der Unterdrückung schädlicher Bakterien zugeschrieben<sup>47)</sup>. R. Greig-Smith<sup>50)</sup> zeigte 1917, daß verschiedene Actinomyceten Stoffe produzieren, die für andere Bewohner des Bodens giftig sind. R. Lieske beschreibt Actinomyceten, die das Wachstum von *Staphylococcus pyogenes* antagonistisch beeinflussen<sup>51)</sup>. Über eine für *B. mycoides* toxische Substanz, die von *Actinomyces* produziert wird, berichtet J. S. Borodulina<sup>52)</sup>. Unter dem Einfluß des giftigen Stoffes ändern sich die morphologischen und physiologischen Eigenschaften des Bakteriums. Die Zellen verlängern sich, die Sporenbildung unterbleibt, und das Bakterium verliert die Fähigkeit, Ammoniak aus Proteinen in Freiheit zu setzen.

A. Gratia u. S. Dath<sup>53)</sup> isolierten verschiedene Schimmelpilze, vornehmlich Actinomyceten (in ihrer Arbeit *Streptothrix* genannt), welche auf Gelatineplatten andere Bakterien ihrer Umgebung verdrängten oder sie in Suspension zur Auflösung brachten. Ein *Streptothrix*-stamm aus der Luft war besonders aktiv gegen *Staphylococcus*, *B. pyocyaneus* und *V. cholerae*, während *B. coli* und Tuberkelbacillen unempfindlich waren. Eine besonders aktive *Streptothrix*-art wurde aus einer unreinigten Vaccineampulle isoliert, sie wirkte auch auf *Coli*, Diphtherie-, Typhus- und Paratyphuserreger lytisch. Das Filtrat einer Bouillon-Kultur von *Streptothrix* löste sehr schnell eine dichte Suspension von Bakterien. Auch ein Extrakt der zerriebenen Pilze übt die gleiche Wirkung aus. Russische Autoren<sup>54)</sup> berichten ebenfalls über einen bactericiden Stoff aus Actinomyceten, der besonders auf Proactinomyceten, Mykococcen, Mykobakterien und Mikroccocce, dagegen weniger stark auf sporentragende und gar nicht auf sporenlose Bakterien wirkt. Pathogene *Staphylococcus* und Tuberkelbacillen wurden ebenfalls angegriffen. Die Zellen werden dabei entweder gelöst oder sterben ohne Lysis. Die bactericide Substanz ist filtrierbar und thermostabil. Über eine ebenfalls thermostabile, wasserlösliche Substanz aus *Actinomyces violaceus* Gasp. berichtet A. J. Kriß<sup>55)</sup>. Der genaue Mechanismus dieser Bakteriolyse konnte jedoch auch später noch nicht aufgeklärt

werden<sup>56)</sup>. M. Welsch hat dem lytischen Prinzip den Namen *Actinomycetin* gegeben<sup>57)</sup>. Eine eingehende Untersuchung der Antibiose der Actinomyceten haben S. A. Waksman u. J. W. Foster<sup>58)</sup> vorgenommen. Die stärkste Wirkung fand Waksman später bei einer Art, der er den Namen *Actinomyces antibioticus* gab<sup>59)</sup>. Die toxische Substanz hatte eine starke wachstumshemmende Wirkung gegenüber allen geprüften Bakterien, Actinomyceten und anderen Pilzen. Sie erhielt den Namen *Actinomycin*<sup>60)</sup>. Der Pilz wurde auf Pepton-Stärke-Nährboden gezüchtet. Nach 6—10 Tagen bei 25—30° war die Nährlösung dunkelbraun gefärbt. Die bakteriostatische Substanz wurde aus der Nährlösung mit Äther extrahiert. Aus dem Verdampfungsrückstand wurde durch Petroläther eine Substanz herausgelöst, die nur sehr geringe bakteriostatische, aber sehr starke, wenn auch schwankende bactericide Wirkung besitzt. Sie ist farblos und wurde *Actinomycin B* genannt, während Actinomycin A in Petroläther unlöslich ist und durch chromatographische Adsorption an Aluminiumoxyd gereinigt und in Form zinnroter Plättchen vom F. 250° gewonnen wurde. Es ist optisch aktiv ( $[\alpha]_D^{25} = -320^\circ$ ), hat ein Molgewicht von etwa 800 und scheint eine polycyclische Stickstoff-Verbindung zu sein. Durch Natriumditionit wird die Substanz reduziert, die Farbe schlägt dabei von Rot in Hellgelb um. Beim Schütteln an der Luft kehrt die rote Farbe wieder zurück. Die höchste Wirksamkeit zeigt Actinomycin gegenüber gewissen gram-positiven Bakterien (*B. mycoides*, *B. subtilis*, *Sarcina lutea*), deren Entwicklung es in einer Verdünnung von 1 : 10 bis 1 : 100 Mio. noch vollständig hemmt<sup>61)</sup>. Auch für höhere Tiere ist Actinomycin hochtoxisch. 20  $\gamma$  töten eine Maus von 20 g innerhalb 24 bis 48 h<sup>62)</sup>. Unter den zahlreichen anderen Actinomyceten, die ebenfalls antibiotische Eigenschaften besitzen, konnte kein anderer Stamm isoliert werden, der Actinomycin oder einen ähnlichen Farbstoff produziert. 250 verschiedene Stämme wurden untersucht.

Um die Frage der therapeutischen Anwendbarkeit von Actinomycin bei bakteriellen Infektionen zu prüfen, wurde eine genaue pharmakologische Untersuchung vorgenommen<sup>63)</sup>. Einmalige intravenöse Injektionen von etwa 1 mg/kg sind bei Mäusen und Ratten tödlich. Der Tod erfolgt jedoch nicht sofort, sondern meist später als nach 24 h. Bei länger dauernder Beobachtung ist 0,5 mg/kg die absolut tödliche Gabe. Man beobachtet bei den Tieren Durchfälle und Hämaturie, Kongestion der inneren Organe und eine auffallende Verkleinerung der Milz. Bei kleinerer Dosierung sind schon 0,05 mg/kg und Tag innerhalb von 7 Tagen tödlich. Hierbei ist hauptsächlich die Funktion der Leber gestört. Trotz der hohen antibakteriellen Wirksamkeit in vitro kann man mit einmaligen Gaben von 0,25, 0,5 und 1,0  $\gamma$  bei Mäusen keinen Schutz gegen hämolytische Streptococce oder Pneumococce erreichen. Nach der Injektion verschwindet Actinomycin sehr schnell aus dem Blut. Nach der Injektion von 2,5  $\gamma$ /20 g Maus konnte schon nach 15 min im Blut kein Actinomycin mehr nachgewiesen werden. Im Harn erschienen innerhalb von 6 h 10—20% der Eingabe.

Ein von Actinomycin und Actinomycetin offenbar verschiedenes Antibioticum aus Actinomyceten wurde von Waksman<sup>64, 65)</sup> „Streptothricin“ genannt. Es besitzt hohe Wirksamkeit gegenüber zahlreichen grampositiven und -negativen Organismen.

A. D. Gardner u. E. Chain<sup>66)</sup> berichten über die Darstellung einer alkaloid-ähnlichen Base aus Proactinomyceten mit hoher antibiotischer Wirksamkeit hauptsächlich gegenüber grampositiven Erregern. Die Substanz wurde mit „Proactinomycin“ bezeichnet.

##### Aspergillus-Arten.

Das Filtrat eines bestimmten Stammes von *Aspergillus flavus* ist, wie von E. C. White<sup>67)</sup> berichtet wird, nicht nur wachstumshemmend, sondern auch bactericid gegenüber einer Anzahl gram-negativer wie gram-positiver Bakterien. Ähnlich, aber weniger aktiv, wurden einige Stämme der *Oryzae-flavus*-Gruppe und *Aspergillus parasiticus* gefunden. Über die Natur des bactericiden Stoffes können noch keine genauen Angaben

<sup>45)</sup> R. E. Buchanan u. E. I. Fuimer: Physiology and Biochemistry of Bacteria, Baltimore 1930, S. 3—28.

<sup>46)</sup> W. L. Holman in Jordan u. Falk: Newer Knowledge of Bacteriology and Immunology, Chicago 1928, S. 102—119.

<sup>47)</sup> S. A. Waksman, Soil. Sci. 43, 51 [1937].

<sup>48)</sup> C. L. Porter u. J. C. Carter, Botanic. Rev. 4, 165 [1938].

<sup>49)</sup> M. Kiese, Klin. Wschr. 22, 505 [1943].

<sup>50)</sup> Proc. Linn. Soc. N. S. Wales 36, 679 [1912]; 40, 631 [1916]; 42, 162 [1917].

<sup>51)</sup> Morphologie und Biologie der Strahlenpilze, S. 130 [1921].

<sup>52)</sup> Microbiol. 4, 561 [1935].

<sup>53)</sup> C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées 91, 1442 (1924); 92, 462 [1925].

<sup>54)</sup> N. A. Krassilnikow u. A. J. Korenjako, Microbiol. 8, 673 (1939).

<sup>55)</sup> Ebenda 9, 32 [1940].

<sup>56)</sup> G. L. W. Wiebels u. K. T. Wieringa: Bacteriophage een algemeen voorkomend verschijnsel, Wageningen 1936.

<sup>57)</sup> Rep. Proc. 3d Internat. Cong. Microbiol. New York, 260 [1940].

<sup>58)</sup> Soil. Sci. 43, 69 [1937].

<sup>59)</sup> S. A. Waksman u. H. B. Woodruff, J. Bacteriol. 40, 581 [1940]; 42, 231 [1941].

<sup>60)</sup> S. A. Waksman u. H. B. Woodruff, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 45, 609 [1940].

<sup>61)</sup> S. A. Waksman u. M. Tishler, J. biol. Chemistry 142, 519 [1941].

<sup>62)</sup> S. A. Waksman, H. Robinson, H. J. Metzger u. H. B. Woodruff, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 47, 261 [1941].

<sup>63)</sup> H. J. Robinson u. S. A. Waksman, J. Pharmacol. exp. Therapeut. 74, 25 [1942].

<sup>64)</sup> S. A. Waksman u. H. B. Woodruff, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 49, 207 [1942].

<sup>65)</sup> J. Bacteriol. 46, 299 [1943].

<sup>66)</sup> Brit. J. exp. Pathol. 23, 123 [1940].

<sup>67)</sup> Science 92, 127 [1940].

gemacht werden. Offenbar handelt es sich um verschiedene Stoffe, die „Aspergillinsäure“<sup>68, 69, 70</sup>) und „Flavacin“<sup>71</sup>) genannt wurden. Dieses besitzt Eigenschaften, welche für die Natur eines Peptides sprechen.

Vielleicht handelt es sich um dieselbe oder eine ähnliche Substanz, die von G. H. Glistler<sup>72</sup>) im Nährmedium eines aus der Luft isolierten Aspergillusstammes aufgefunden wurde. Der Extrakt des Kulturfiltrates hemmte gram-positive und -negative Organismen in einer Verdünnung von 1 : 200 000.

Ein ebenfalls antibakterieller Stoff wird von *Aspergillus clavatus*<sup>73</sup>) ins Nährmedium abgegeben. Er ist hitzebeständig, läßt sich an Tierkohle adsorbieren und mit Äther eluieren. Die äther-lösliche Fraktion zeigt baktericide Eigenschaften in Verdünnungen von 10<sup>-5</sup>. Auch in Gegenwart von Serum ist der baktericide Effekt zu beobachten. Die wirksame Substanz, das Clavatin, wurde von F. Bergel u. Mitarb.<sup>74</sup>) in kristallisierter Form gewonnen. Sie hatte den F. 109,5 bis 110,5° und bildete eine Monoacetyl-Verbindung vom F. 118 bis 120°. Die Bruttoformel war C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>. Offenbar die gleiche Substanz, jedoch nicht kristallisiert, hatten S. A. Waksman u. Mitarb. in Händen. Sie nannten sie „Clavacin“<sup>75</sup>). Nach Bergel ist Clavatin identisch mit dem aus *Penicillium claviforme* gewonnenen Antibioticum „Claviformin“ und dem „Patulin“ aus *P. patulum*, welche weiter unten besprochen werden sollen.

Neben dem im Abschnitt „Chinone“ zu besprechenden Benzochinonen Fumigatin und Spinulosin wurde aus *Aspergillus fumigatus* noch ein drittes antibiotisches Prinzip kristallisiert<sup>71b</sup>) und „Fumigacin“ benannt. Als F. wurde 185—187° angegeben. Es enthält 3,7% Stickstoff und ist aktiv gegenüber gram-positiven Bakterien. Aus *Aspergillus fumigatus* mut. helvola isolierten später Chain, Florey, Jennings u. Williams<sup>76</sup>) ein Antibioticum der Bruttoformel C<sub>32</sub>H<sub>44</sub>O<sub>8</sub> vom F. 204—212°, welches *Staph. aureus* mit 1 : 80 000 total hemmte und das sie „Helvolinsäure“ nannten. Nach einem Referat in „Nature“<sup>77</sup>) haben Menzel, Wintersteiner und Hoogerheide festgestellt, daß das Fumigacin von Waksman nicht einheitlich war, sondern 20% einer andern ebenfalls antibakteriell wirksamen Substanz „Gliotoxin“ der Bruttoformel C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> enthielt, die schon vorher in *Gliocladium fimbriatum* aufgefunden worden war (siehe unter III c!). Das gereinigte Fumigacin war stickstoff-frei und erwies sich in der chemischen Zusammensetzung und der antibakteriellen und in vivo-Aktivität als identisch mit Helvolinsäure. Als antibakterielle Stoffwechselprodukte von *Asp. fumigatus* sind also bis jetzt Fumigatin, Spinulosin, Helvolinsäure (bzw. gereinigtes Fumigacin) und Gliotoxin kristallin dargestellt worden.

### Penicillien.

Zu den ältesten Beobachtungen antibiotischer Wirkung gehört diejenige über den Einfluß von *Penicillium luteum* Zuckal auf *Citromyceten*, die C. Wehmer 1893 in einer Monographie mitteilt<sup>78</sup>): „Die Wirkung des Penicilliums ist eine sehr eigenartige und in den Einzelheiten noch wenig aufgeklärte; junge Polster von *Citromyces* über- und durchwächst es mit großer Schnelligkeit und tötet die berührten Stellen in der Weise ab, daß solche alsbald ein braunes Aussehen annehmen. Gelingt eine einzelne Spore (von *P. luteum*) auf voll entwickelte Decken (von *Citromyces*), so erscheint schon nach wenigen Tagen eine junge Kolonie des Eindringlings, welche nunmehr rapid sich peripherisch ausbreitet und nach einigen weiteren Tagen den größten Teil der Oberfläche einnimmt... Die Abtötung geschieht dem Anschein nach durch Abscheidung irgendeines spezifischen Stoffes.“

Derselbe Effekt bei *P. luteum* und *Spicaria purpurogenes* wird von G. A. Nadson<sup>79</sup>) und Nadson u. A. J. Zolkiewicz<sup>80</sup>) beschrieben. Die beiden Pilze produzieren Pigment, das nicht nur zur Abwehr, sondern auch zum Angriff fremder Organismen dient. Hierbei werden diese gefärbt und getötet. T. Paley u. P. Osicheva beobachteten, daß *P. luteum purpuro-*

*genum* eine thermostabile Substanz produziert, die in Äther und Chloroform löslich ist und Wachstum und Säureproduktion von *Aspergillus niger* antagonistisch beeinflusst<sup>81</sup>). Ebenfalls auf einen Farbstoff wird die fungicide Wirkung von *P. africanum* zurückgeführt<sup>82</sup>). Das Penicillium zeigt verstärkte Farbstoffbildung in Kontakt mit anderen Pilzen wie *Aspergillus niger*. Das Pigment dringt in das Mycel des letzteren ein und tötet ihn.

### Penicillin.

Die meiste Beachtung von allen antibiotischen Stoffen hat eine Substanz gefunden, die vor 14 Jahren in England entdeckt wurde.

Im Jahre 1929 wurde von dem englischen Bakteriologen Alexander Fleming berichtet, daß in seinem Laboratorium auf Agarplatten mit Staphylococcenkulturen sich manchmal Schimmelpilze ansiedelten, welche sich mehr und mehr ausbreiteten und schließlich die Bakterien völlig unterdrückten. Er führte diese Wirkung auf die Ausscheidung eines antibakteriellen Stoffes durch das Penicillium zurück. Diesen Stoff nannte Fleming Penicillin<sup>83</sup>). Die Substanz blieb lange Zeit wenig beachtet, bis sie in den letzten Jahren die Aufmerksamkeit zahlreicher Biologen, Chemiker und Mediziner in aller Welt auf sich gezogen hat. Fleming hatte den Penicillin bildenden Schimmelpilz als *P. rubrum* identifiziert, während P. W. Clutterbuck, R. Lovell u. H. Raistrick<sup>84</sup>) ihn zur *Chrysogenum*-Serie gehörig als *P. notatum* Westling bezeichneten. Während nach Raistrick der gelbe Farbstoff und die antibakterielle Wirkung immer zusammen gingen, glaubt R. D. Reid<sup>85</sup>), daß die beiden Stoffe nicht miteinander identisch sind. Die Eigenschaften des Penicillins machen die Reindarstellung und Kristallisation zu einer äußerst schwierigen Aufgabe. Die später zu beschreibenden hochwirksamen Präparate waren noch immer stark gelb gefärbt.

**Kultur des penicillin-produzierenden Pilzes<sup>86</sup>.** Der penicillin-produzierende Pilz wächst auf den verschiedensten Nährböden ausgezeichnet. Ebenso gut wie auf Pepton-Fleischwassernährböden gedeiht er auf einem einfachen synthetischen Nitrat-Boden nach Czapek-Dox<sup>84</sup>). Dieser enthält 3 g NaNO<sub>3</sub>, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g KCl, 0,5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,01 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 40 g Glucose in 1 l Wasser; zur Beschleunigung des Wachstums kann man noch 5—10% Hefeextrakt hinzufügen. Die Schichtdicke soll nicht größer als 1,5—2 cm sein.

Die Impfung geschieht mit einer Sporensuspension. Nach 24 h sieht man das erste flaumartige Wachstum am Boden des Kolbens. Am 3. Tag tritt meist das erste Wachstum an der Oberfläche in kleinen Inseln auf. Bis zum 4. oder 5. Tag schließt sich die Decke. Das Mycel ist weiß. Es wird in den nächsten Tagen allmählich blaugrün. In späteren Stadien geht es schließlich in Grau über. Wenn die grünblaue Farbe des Mycels aufzutreten beginnt, wird auch das Nährmedium hellgelb gefärbt.

Die genannten Veränderungen sind auch von Veränderungen im pH der Nährlösung begleitet. Am Anfang ist es zwischen 6 und 7, am 3. Tag etwa 3. Mit der Bildung des Oberflächenmycels steigt es wieder an, wird 5, wenn die blaugüne Farbe des Mycels und die erste Gelbfärbung der Lösung auftritt. In diesem Stadium beginnt auch die Penicillin-Ausscheidung. Das pH steigt weiter an, der Penicillin-Gehalt und die Farbstoffmenge ebenso. Wenn pH 7 erreicht ist, ist die Penicillin-Produktion auf dem Höhepunkt. Oft fällt sie bei weiterem Wachstum, wobei das pH schließlich bis auf 8,8 ansteigen kann, sehr schnell ab.

Wie viele Eigenschaften der Mikroorganismen ist auch die Produktion von Penicillin nicht konstant. In manchen Ansätzen entstand nur wenig oder gar nichts. Dies kann manchmal auch auf Verunreinigungen durch Bakterien zurückzuführen sein, da nach E. P. Abraham u. E. Chain<sup>87</sup>) Penicillin durch gewisse Bakterien zerstört wird.

**Der Test.** Absolute Werte der hemmenden Konzentration der zu prüfenden Lösung erhält man durch Prüfung auf bakterienhemmende Wirkung von Verdünnungsreihen im Reagensglas<sup>88</sup>). Demgegenüber gibt der Oxforde Test<sup>89</sup>) nur Relativwerte an, ist jedoch schneller und braucht weniger Substanz. Für die Anreicherung unbekannter Stoffe aus Nährlösungen scheint er von Vorteil zu sein. Gewöhnliche Nähragarplatten werden mit einer Bouillonkultur von *Staph. aureus* beimpft, indem man die Bakteriensuspension über die Oberfläche der Platte fließen läßt. Der Überschuss wird abgossen. Dann werden die Platten bei 37° getrocknet. Im Test setzt man einen kleinen Glaszylinder auf die Platte auf und füllt ihn mit der zu prüfenden Lösung. Die Platten werden dann 12—16 h bei 37° inkubiert. Danach ist die Hauptmenge der

<sup>68</sup>) E. C. White u. Hill, J. Bacteriol. 45, 433 [1943].

<sup>69</sup>) Jones, Rake u. Hamre, ebenda 45, 461 [1943].

<sup>70</sup>) Menzel, Wintersteiner u. Rake, ebenda 48, 109 [1943].

<sup>71</sup>) Bush u. Gath, J. Pharmacol. exp. Therapeut. 78, 164 [1943].

<sup>72</sup>) Nature [London] 148, 470 [1941].

<sup>73</sup>) B. P. Wiesner, ebenda 149, 356 [1942].

<sup>74</sup>) F. Bergel, A. L. Morrison, A. R. Moss, R. Klein, H. Rinderknecht u. J. L. Ward, Nature [London] 152, 750 [1943].

<sup>75</sup>) Waksman, Horning u. Spencer, Science 98, 202 [1942]; J. Bacteriol. 45, 233 [1943].

<sup>76</sup>) Brit. J. exp. Pathol. 24, 108 [1943].

<sup>77</sup>) Nature [London] 153, 531 [1944].

<sup>78</sup>) Beiträge zur Kenntnis einheimischer Pilze, Hannover u. Leipzig 1891, S. 70.

<sup>79</sup>) Bul. Jard. Bot. Repub. Russe Sup. I, 21, 13 [1922].

<sup>80</sup>) Ebenda Sup. I 21, 1 [1922].

<sup>81</sup>) Trudi Nauchno-Izsljed. Inst. Pischtech. Promish. III, 4, 146 [1936].

<sup>82</sup>) H. Doebelt, Ann. Mycol. 7, 315 [1909].

<sup>83</sup>) Brit. J. exp. Pathol. 10, 226 [1929].

<sup>84</sup>) J. Bacteriol. 27, 28 [1934]; 29, 215 [1935].

<sup>85</sup>) E. P. Abraham, A. D. Gardner, E. Chain, N. G. Heatley, C. M. Fletcher, M. A. Jennings u. H. W. Florey, Lancet 241, 177 [1941].

<sup>86</sup>) Nature [London] 148, 837 [1940].

<sup>87</sup>) J. W. Foster, J. biol. Chemistry 144, 285 [1942].



Flüssigkeit in den Agar diffundiert, und es hat sich ein bakterienfreier Hof um den Glaszylinder gebildet, dessen Durchmesser ein Maß für die Wirksamkeit der geprüften Lösung ist.

In der letzten Zeit wurden aus dem Merckschen Laboratorium in Rahway, New Jersey<sup>89)</sup>, einige Verbesserungen dieses Testes mitgeteilt. An Stelle der sehr variablen Staphylococci wird eine Sporenkultur von *B. subtilis* zum Test benutzt. Die Sporenkulturen können unbegrenzt im Eisschrank aufbewahrt werden. Man bestimmt einmal die optimale Menge, die als Inoculum dienen soll (0,1—0,4 cm<sup>3</sup>/200 cm<sup>3</sup> Agar). Diese gleiche Menge wird dann genommen, solange die Kultur in Gebrauch ist. Mit der Sporenkultur kann der geschmolzene Agar beimpft werden, bevor er in Platten gegossen wird. Das Wachstum beginnt bei dieser Methode etwas später, so daß die Substanz vollständiger diffundieren kann. Es bildet sich eine messerscharfe Grenze zwischen Wachstum der Subtilis-Bacillen und der Hemmungszone durch Penicillin-Wirkung. Als Penicillin-Einheit wurde von der Oxford Gruppe diejenige Menge bezeichnet, die gelöst in 1 cm<sup>3</sup> eine Hemmungszone von 24 mm Dmr. hervorruft.

Von J. C. Turner, F. K. Heath u. B. Magasanik<sup>90)</sup> wurde gefunden, daß Penicillin die Aktivität von Urease hemmt. Sie schlagen vor, diese Erscheinung zur Bestimmung kleiner Penicillin-Mengen im Blut von Personen, die mit Penicillin behandelt werden, zu benützen. Die Hemmung entsprach bei Merckschem Handelspräparat von etwa 200 Einheiten/mg und gereinigtem Bariumsalz von 850 Einheiten/mg etwa der bakteriostatischen Aktivität. Sie betrug bei einer 0,05%igen Urease-Lösung und 1000 Einheiten Penicillin/cm<sup>3</sup> etwa 50%.

**Reinigung.** Zur Reinigung des Penicillins wurden die Kulturlösungen mit Phosphorsäure auf pH 2 angesäuert und mit Amylacetat oder Äther extrahiert. Die Extrakte wurden dann mit Phosphat-Puffer oder Wasser von pH 6—7 ausgeschüttelt, wobei das Penicillin in die wäßrige Phase geht. Es wird dann wieder auf pH 2 angesäuert und mit Äther extrahiert. Die ätherische Lösung wird durch eine Säule von Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> gegossen, wobei mehrere Zonen entstehen. In der zweitobersten, hellgelben Zone findet man das meiste Penicillin. Nach der Elution mit m/15 Phosphat-Puffer (pH 7,7) wird nochmals mit Äther extrahiert und nach der Neutralisation wieder in wäßriger Lösung aufgenommen. Sie enthält 80% des Penicillins, welches in die Säule gegossen wurde, und ist tief rötlich orange gefärbt, in verdünnter Lösung gelb, hat einen charakteristischen Geruch und bitteren Geschmack. Dieses Penicillin wurde „therapeutisches Penicillin“ genannt und für die ersten therapeutischen Versuche verwendet. Es ist aber noch sehr unrein. Es enthält 40—50 Einheiten/mg Trockengewicht. Es ist in wäßriger, mit Äther gesättigter Lösung im Eisschrank mehrere Monate haltbar; besser aber in Form des Ba-Salzes. Für ein Ba-Salz, das 500 Einheiten/mg enthielt, wurde die Summenformel C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>O<sub>10</sub>N<sub>2</sub>Ba angegeben<sup>91)</sup>. In späteren Mitteilungen über Abbauprodukte des Penicillins wurden aber Ba-Salze verwendet, die 1000 oder 1200 Oxford-Einheiten/mg enthielten, so daß die genannte Summenformel wohl noch korrigiert werden dürfte. Nach einer nur im Referat vorliegenden Arbeit aus den Verein. Staaten ist es dort gelungen<sup>92)</sup>, Penicillin vom Reinheitsgrad 1650 Oxford-Einheiten/mg darzustellen. Das Präparat ist farblos.

Im rohen Penicillin vor der chromatographischen Reinigung ist eine fiebererregende Substanz enthalten, welche an der Säule in einer dunkel gefärbten Zone unterhalb der Penicillin-Zone zusammen mit wenig Penicillin adsorbiert wird.

Eine andere Reinigungsmethode ist von J. R. Catch, A. H. Cook u. I. M. Heilbron<sup>93)</sup> beschrieben worden. Sie besteht in einem Verteilungschromatogramm an wäßrigem Silicagel zusammen mit einer anorganischen Base, wie z. B. BaCO<sub>3</sub>. Sie schieden Penicillin als Sr-Salz ab, das bis zu 750 Einheiten/mg enthielt. Die Analyse des Sr-Salzes führte zu der Formel C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>O<sub>11</sub>NSr.

**Abbauprodukte des Penicillins.** Die sauren Hydrolysate von Penicillin geben eine starke blauviolette Farbreaktion mit Ninhydrin. Unter gleichen Hydrolysebedingungen geht die Stärke der Ninhydrin-Reaktion parallel mit der Wirksamkeit von Penicillin-Präparaten. Von den reinsten Präparaten konnten ungefähr 59% des Gesamt-Stickstoffs nach der Hydrolyse als Amino-N nach Van Slyke erfaßt werden. Die Substanz, die die Ninhydrin-Reaktion und den Van-Slyke-Amino-Stickstoff liefert, scheint somit ein wichtiger Bestandteil der

Penicillin-Molekel zu sein. Sie ist eine Base, die als Hydrochlorid kristallisiert wurde und die Zusammensetzung C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>4</sub>N·HCl besitzt<sup>94)</sup> und Penicillamin genannt wurde.

Penicillamin gibt eine tiefblaue Färbung mit Eisen(III)-chlorid, reduziert ammoniakalische Silber-Lösung und Jod. Neben den Eigenschaften einer normalen Aminosäure hat Penicillamin also auch solche, die charakteristisch für Ascorbinsäure sind.

Beim sehr schonenden Abbau bei pH = 2 soll nach W. M. Duffin u. S. Smits<sup>95)</sup> eine Säure gebildet werden, die in einer Ausbeute von 20% aus Penicillin von 1200 Einheiten/mg in kristallisiertem Zustand erhalten wurde. Auch hier ist die Ausbeute bei Anwendung verschieden wirksamer Präparate direkt proportional der Wirksamkeit.

Catch, Cook u. Heilbron<sup>93)</sup> erhielten mehrere Abbauprodukte: Eine farblose Säure, ein gelbes Pigment der Formel C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>, Acetaldehyd und eine kleine Menge eines α,β-ungesättigten Aldehyds C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>O, die aber weder selbst kristallisiert zu sein noch kristalline Derivate zu liefern scheinen.

**Konstitution.** Penicillin ist eine starke zweibasische Säure, pK<sub>1</sub> = 2,3 und pK<sub>2</sub> = 3,5. Es enthält weiter zwei Hydroxyl-Gruppen, eine Keto-Gruppe und einen Lacton-Ring. Durch Chromsäure-Oxydation wurden mindestens 5 C·CH<sub>3</sub>-Gruppen nachgewiesen. Nach der Lichtabsorption ist eine α,β-ungesättigte Keto-Gruppe möglich (λ<sub>max</sub> bei 2650—2800 Å). Penicillin soll der hydroaromatischen Reihe angehören. Durch Einwirkung von Diazomethan, -äthan und -butan auf Penicillin wurden die Methyl-, Äthyl- und Butylester<sup>96)</sup> gewonnen. Andererseits wurden auch die Hydroxyl-Gruppen mit Essigsäure verestert<sup>97)</sup>.

Die Konstitution des Penicillins ist somit nach der uns bisher vorliegenden Literatur noch vollständig ungewiß, und auch die Bruttoformeln müssen mit großem Vorbehalt angegeben werden.

**Die bakteriostatische Wirksamkeit von Penicillin.** Die Wirksamkeit von Penicillin ist sehr unterschiedlich bei den verschiedenen Bakterienarten, die als Testorganismus genommen werden. Als empfindlich gegenüber Penicillin zeigten sich fast sämtliche Staphylococci, Streptococci, Micrococci, Cryptococci, Clostridien, Diphtherie-, Akne- und Milchsäure-Bacillen. Bei diesen Arten liegen jedoch z. T. noch keine quantitativen Angaben vor. Ein ungefähres Bild der relativen Wirkung gegenüber verschiedenen Organismen gibt Tab. 2.

Organismus	Total hemmende Konz. %/cm <sup>3</sup>	Partiell hemmende Konz. %/cm <sup>3</sup>
N. gonorrhoeae	0,5	0,5
N. meningitidis	1,0	0,5
Staph. aureus	1,0	0,5
Strep. pyogenes	1,0	0,5
B. anthracis	1,0	0,5
A. bovis (hominis)	1,0	0,5
Cl. tetani	1,0	0,5
Cl. welchii	0,66	
Cl. septicum	3,33	0,66
Cl. oedematis	3,33	
Strep. viridans	1,6	
„	250,0	125,0
Pneumococcus	4,0	2,0
„	110,0	
C. diphtheriae (mitis)	8,0	
„ (gravis)	31,2	15,6
S. gärtneri	50,0	25,0
S. typhi	100,0	33,3
Anaerobe Streptococci	250,0	125,0
„	250,0	250,0
Proteus	250,0	31,2
Past. pestis	1000,0	10,0
S. typhimurium	> 1000,0	125,0
S. paratyphi B	> 1000,0	200,0
Bact. dysenteriae Shiga	500,0	250,0
Br. abortus	500,0	250,0
Br. melitensis	> 1000,0	400,0
V. cholerae	> 1000,0	> 1000,0
Bact. friedländeri	> 1000,0	> 1000,0
Ps. pyocyanea	> 1000,0	> 1000,0
Myco. tuberculosis	> 1000,0	> 1000,0
L. icterohaemorrhagiae	> 278,0	> 278,0
B. coli	> 1000,0	> 1000,0

Tabelle 2.

Die Hemmung verschiedener Bakterienarten durch Penicillin.

Es muß betont werden, daß die Werte mit Penicillin-Fractionen aus einem frühen Stadium der Reinigung erhalten wurden und daher keineswegs endgültig sind. Die späteren Werte für völlige Hemmung bei einigen penicillin-empfindlichen

<sup>89)</sup> J. W. Foster u. H. B. Woodruff, J. biol. Chemistry **148**, 723 [1943].

<sup>90)</sup> Nature [London] **152**, 326 [1943].

<sup>91)</sup> E. P. Abraham, W. Baker, E. Chain, H. W. Florey, E. R. Holiday, R. Robinson, Nature [London] **149**, 356 [1942].

<sup>92)</sup> J. Amer. pharmac. Assoc. **5**, 106 [1944].

<sup>93)</sup> Nature [London] **150**, 633 [1942].

<sup>94)</sup> E. P. Abraham, E. F. Chain, W. Baker u. R. Robinson, Nature [London] **151**, 107 [1943].

<sup>95)</sup> Ebenda **151**, 251 [1943].

<sup>96)</sup> K. Meyer, Hobby u. Chaffee, Science **97**, 205 [1943].

<sup>97)</sup> K. Meyer, Hobby, Dawson, Schwenk u. Fleischer, ebenda **96**, 20 [1942].

Bakterien liegen bei 1 : 25—150 Mio.<sup>98)</sup>. Manche Bakterienarten sind völlig unempfindlich gegenüber Penicillin. Dies wird von Abraham u. Chain<sup>97)</sup> auf die Bildung eines penicillin-zerstörenden Enzyms „Penicillinase“ durch derartige Bakterien zurückgeführt. 0,2 cm<sup>3</sup> eines dialysierten Extraktes von *B. coli* zerstörten 1 mg Penicillin bei 37° in 3 h, während das gleiche Präparat nach 5 min Erhitzen auf 90° gegenüber Penicillin unwirksam war. Penicillin zerstörendes Ferment konnte aus Staphylococcen und anderen Bakterien, die gegenüber Penicillin hoch empfindlich sind, nicht gewonnen werden. Die Penicillinase wird jedoch von den Bakterien nicht an die Nährlösung abgegeben, sie geht erst nach Zerstörung der Zellen in Lösung. Folgende Bakterienarten wurden als penicillin-unempfindlich erkannt: *Staph. albus*<sup>99)</sup>, *Streptoc. faecalis* (*Enterococcus*)<sup>83, 100, 101, 102)</sup>, *Streptoc. liquefaciens zymogenes durans*<sup>100)</sup>, *Micrococ. albus*<sup>99)</sup>, *Micrococ. flavus*<sup>103)</sup>, Saprophyt. gram-neg. Coccen<sup>83)</sup>, *B. subtilis*<sup>103, 104, 105)</sup>, *B. mycoides*<sup>105)</sup>, *B. adhaerens*<sup>108)</sup>, *Mycobact. tuberculosis*<sup>86)</sup>, *B. pyocyaneus*<sup>86, 83, 99)</sup>, *B. prodigiosus*<sup>99, 103)</sup>, *Ps. fluorescens*<sup>99, 104)</sup>, *Ps. aeruginosa*<sup>107)</sup>, *B. coli*<sup>83, 84, 104, 86, 99, 97, 105, 102)</sup>, *B. aerogenes*<sup>102, 105, 108)</sup>, *B. paratyphosus*<sup>83, 86, 99)</sup>, *B. enteritidis*<sup>99)</sup>, *B. typhi murium*<sup>86)</sup>, *B. pullorum*<sup>83)</sup>, *B. pneumoniae* (Friedl.)<sup>83, 86, 102, 99)</sup>, *Past. pestis*<sup>86, 109)</sup>, *B. pseudotuberculosis rodentium*<sup>83)</sup>, *Brucella melitensis*<sup>86, 110)</sup>, *Brucella abortus*<sup>86, 110, 111)</sup>, *B. influenzae* (Pfeiffer)<sup>83, 112, 84, 99)</sup>, *B. pertussis*<sup>113, 114)</sup>, *B. parainfluenzae*<sup>113)</sup>, *Vibrio cholerae*<sup>83, 86, 110)</sup>, *Leptosp. ikterohaemorrhagiae*<sup>86)</sup>.

Serum, Blut, Eiter, Gewebeatolysate und Peptone enthalten keine zum Penicillin antagonistischen Stoffe. Dies ist ein Vorteil gegenüber Sulfonamiden, deren Wirksamkeit durch die in den meisten natürlichen Medien enthaltene p-Amino-benzoesäure antagonistisch beeinflusst wird<sup>115)</sup>. Auch ist die bakterio-statische Wirksamkeit im Gegensatz zu den Sulfonamiden<sup>116)</sup> unabhängig von der Größe der Einsaat beim Test. Obwohl also Penicillin nicht den für Sulfonamide charakteristischen Enthemmungseffekt zeigt, ist es jedoch keineswegs baktericid. Dies konnte dadurch gezeigt werden, daß eine durch Penicillin 1 : 1000 im Wachstum völlig gehemmte Staphylococcenkultur in ihrer Sauerstoff-Aufnahme 3 h lang vollständig unbeeinflusst blieb. Beim Abimpfen von einer Kultur, die 24 h bei 37° in einer Nährlösung gehalten wurde, die 1 : 1000 Penicillin enthielt, gingen zahlreiche Kolonien wieder an<sup>86)</sup>.

Auf das Wachstum und die Lebensfähigkeit normaler Zellen des höheren Organismus hat Penicillin nur einen sehr geringen Einfluß. In einer Lösung von „therapeutischem Penicillin“ der Konzentration 1 : 500 zeigten Leucocyten normale Beweglichkeit. Mit Konzentrationen, die geringer als 1 : 5000 sind, war keinerlei Einfluß auf das Wachstum von Kulturen verschiedenartigster Gewebe festzustellen. Es bestand kein Unterschied in der Hemmbarkeit von Fibroblasten und Epithelzellen. Auch bei Penicillin gibt es eine Gewöhnung der Bakterien an den Hemmstoff. Durch mehrere Monate fortgesetzte Kultivierung in Lösungen, die steigende Mengen Penicillin enthielten, konnte bei häufiger Überimpfung eine weitgehende Adaptation eines zunächst hochempfindlichen Staphylococcus erreicht werden. Während der Ausgangsstamm noch mit 1 : 1 Mio. eines rohen Präparates völlig gehemmt war, wuchs der adaptierte Stamm noch bei 1 : 1000 völlig ungehemmt. Worauf diese Adaptation zurückzuführen ist, wurde nicht festgestellt. Aus dem adaptierten Stamm konnte ebensowenig Penicillinase extrahiert werden wie aus dem hochempfindlichen Ursprungsstamm. Der adaptierte Stamm zeigte sich jedoch in seinen fermentativen Eigenschaften um vieles schwächer als der Ursprungsstamm, auch war das Wachstum auf Peptonwasser wesentlich schlechter.

**Aufnahme und Ausscheidung.** Bei Kaninchen, Katzen und Menschen wurde die Aufnahme und Ausscheidung von Penicillin

untersucht. Bei Kaninchen konnte weder bei subcutaner, intravenöser Injektion oder Verabfolgung durch eine Dünndarmfistel eine nennenswerte Penicillin-Aktivität des Blutes für längere Zeit hergestellt werden. Bereits ½ h nach der Gabe war das Penicillin vollständig aus dem Blut verschwunden. 20—50% des injizierten Penicillins wurden im Urin wiedergefunden, während von dem durch den Dünndarm verabfolgten weniger als 20% im Urin auftraten. Bei den Katzen zeigte das Blut noch mindestens 1½ h nach der Injektion eine kräftige Aktivität, die jedoch auch nach 3—4 h verschwand. 50—70% des Penicillins wurden mit dem Harn wieder ausgeschieden. Der Mensch verhält sich gegenüber Penicillin ebenso wie die Katze<sup>86)</sup>.

**Therapeutische Anwendung.** Über die therapeutische Anwendung von Penicillin liegen schon zahlreiche Angaben vor. Die Versuche über die schnelle Ausscheidung durch den Organismus des Menschen zeigten bereits, daß zur Aufrechterhaltung eines nennenswerten Penicillin-Spiegels im Blut häufige Injektionen erforderlich sind. Die perorale Darreichung erscheint sehr verlustreich, da Penicillin beim normalen pH des Magens schnell zerstört wird. Doch wird auch ein Versuch beschrieben, bei welchem durch Pufferung bzw. durch gleichzeitige Gabe von Natriumhydrogencarbonat mit dem Penicillin, dieses während einer siebentägigen Behandlung dauernd im Harn nachweisbar blieb. Die bei der oralen Einnahme erzielte Aktivität des Blutes bleibt jedoch auf jeden Fall gering gegenüber derjenigen nach Injektion in die Blutbahn. Als günstigste Form, um einen größeren Gehalt an Hemmstoff für längere Zeit im Blut aufrecht zu halten, hat sich die intravenöse Dauerinfusion erwiesen. Hierbei wurden in 24 h 500 cm<sup>3</sup> einer Lösung, die 1,05% Citrat und 0,8% Natriumchlorid enthielt, durch eine Venenkanüle einfließen gelassen und alle 2 h eine Penicillin-Dosis von 100—200 mg in den Apparat injiziert. Guten Erfolg hatte auch die intramuskuläre Injektion alle 3 h<sup>117)</sup>.

Die rektale Verabfolgung erscheint unzweckmäßig, da die Faeces Penicillin vermutlich durch Bakterienwirkung inaktivieren.

Nach diesen Erfahrungen scheint Penicillin zur inneren Behandlung hauptsächlich zur Verwendung in der Klinik geeignet zu sein. Eines der wichtigsten Anwendungsgebiete des Mittels scheint aber die lokale Applikation bei äußerlichen Infektionen zu sein. Bei besonders hartnäckigen und meist ohne Erfolg mit Sulfonamiden vorbehandelten Infektionen der Augen und von Wunden, insbes. Brandwunden, wurde es so mit überraschend schnellem Erfolg angewandt. Die Form der Anwendung ist hier entweder die lokale Spülung mit wäßrigen Lösungen oder die Einstreuung von Puder, der ein Salz des Penicillins enthält. Am besten geeignet erscheint das Calcium-Salz, weil es am wenigsten hygroskopisch ist. Für die Behandlung von Brandwunden hat sich die Anwendung einer penicillin-haltigen Salbe am besten bewährt. Die Behandlung erscheint vor allem zur Bekämpfung sulfonamid-resistenter hämolytischer Streptococcen und Staphylococcen geeignet<sup>118)</sup>. Alle angegebenen 54 Fälle von Brandwundeninfektionen sprachen auf das Mittel an. In 41 Fällen von diesen waren die hämolytischen Streptococcen innerhalb von 3—5 Tagen nach der ersten Penicillin-Gabe völlig verschwunden und traten auch nach der Absetzung des Mittels nicht wieder auf. Die Staphylococcen erwiesen sich als ein wenig resistenter, aber auch sie waren nach wenigen Tagen nicht mehr nachweisbar. Die minimale Dosierung für die hämolytischen Streptococcen ist die viermalige Anwendung einer Penicillin-Salbe, die 100—150 Oxfordeinheiten je Gramm enthält. Zur sicheren Vernichtung der hämolytischen Staphylococcen genügt eine Salbe mit 200—210 Oxfordeinheiten je Gramm.

In Übereinstimmung mit den in vitro-Testen von Abraham u. Mitarbeitern<sup>86)</sup> zeigten sich auch in vivo in den Wunden *B. coli*, *B. proteus* und *Ps. pyocyanea* als penicillin-resistent. Über die Bekämpfung von Anaerobiern wie *B. anthracis*, *Cl. tetani* und *V. septique* liegen uns keine Berichte vor. Doch scheint hierfür nach den in Tabelle 2 mitgeteilten in vitro-Versuchen Penicillin als aussichtsreich. Da die Flora der meisten offenen Wunden ein Gemisch verschiedener Organismen darstellt, die sich z. T. noch synergistisch im Wachstum zu fördern vermögen (s. oben S. 166), kann man vorläufig nicht erwarten, mit einem einzigen Mittel der infektiösen Keime Herr zu werden, wenn diese so wie die Sulfonamide und Penicillin so große Unterschiede in der bakterio-statischen Wirk-

<sup>98)</sup> A. H. Cook, Biochemic. J. 36, Proc. XXIII [1942].

<sup>99)</sup> Hobby, Meyer u. Chaffee, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 50, 277 [1942].

<sup>100)</sup> Bornstein, J. Bacteriol. 39, 383 [1940].

<sup>101)</sup> Heilmann u. Herell, ebenda 43, 12 [1942].

<sup>102)</sup> McKee u. Rake, ebenda 43, 645 [1942].

<sup>103)</sup> A. Fleming, J. Pathol. Bacteriology 35, 831 [1942].

<sup>104)</sup> Reid, J. Bacteriol. 29, 215 [1932].

<sup>105)</sup> S. A. Waksman u. Woodruff, ebenda 44, 373 [1942].

<sup>106)</sup> Foster u. Wilker, ebenda 46, 377 [1943].

<sup>107)</sup> Crowe, Fisher, Ward u. Foley, Ann. Ot. 62, 541 [1943].

<sup>108)</sup> Robinson, J. Pharmacol. exp. Therapeut. 77, 70 [1943].

<sup>109)</sup> A. Fleming, Lancet 242, 732 [1942].

<sup>110)</sup> Gardner, Nature [London] 146, 837 [1940].

<sup>111)</sup> Kocholaty, J. Bacteriol. 44, 469 [1942].

<sup>112)</sup> A. Fleming u. McLean, Brit. J. exp. Pathol. 11, 127 [1930].

<sup>113)</sup> A. Fleming, J. Pathol. Bacteriology 35, 831 [1932].

<sup>114)</sup> McLean, Lancet 239, 345 [1940].

<sup>115)</sup> D. D. Woods, Brit. J. exp. Pathol. 21, 90 [1940].

<sup>116)</sup> H. N. Green, ebenda 21, 38 [1940]; T. C. Stamp, Lancet 237, 10 [1939].

<sup>117)</sup> M. E. Florey u. H. W. Florey, Lancet 244, 387 [1943].

<sup>118)</sup> A. M. Clark, L. Colebrook, Th. Gibson u. M. L. Thomson, ebenda 244, 605 [1943].

samkeit gegenüber verschiedenen Organismen zeigen. Es erscheint aussichtsreich, die Mischinfektionen auch mit einem Gemisch verschiedener Chemotherapeutika zu bekämpfen, dessen einzelne Komponenten die verschiedenen Bakterienarten der gemischten Flora hemmen.

Vor kurzem erschien ein Bericht über Penicillin, den der Ausschuß für Chemotherapie des National Research Council ausgegeben hat<sup>119)</sup>. Hierin wird über die Erfahrungen von 32 verschiedenen Forschern berichtet, die Penicillin an 500 Fällen von Infektionskrankheiten angewendet haben, nachdem das Mittel nunmehr in den U. S. A. und in England in beschränktem Umfange erhältlich ist.

Es kommt in Ampullen von 5000, 10 000, 25 000 und 100 000 Einheiten in den Handel. Das Präparat ist zu 10–15% reines Penicillin. Die Lösung wird vor der Behandlung jedesmal frisch hergestellt, da sie recht instabil ist. Die Konzentration beträgt für Injektionen 1000 Oxford-Einheiten/cm<sup>3</sup>, für Tropfinfusionen 25–50 Einheiten/cm<sup>3</sup>. In 24 h wurden 120 000–240 000 Einheiten verabfolgt. Lokal wurde mit Kompressen (250–500 Einheiten/cm<sup>3</sup>) oder mit Injektionen in die infizierte Körperhöhle (Gelenke, Pleura, Pericard, Liquorraum) behandelt. Da zur Erzielung einer genügenden Konzentration im Blut sehr unterschiedliche Dosen notwendig sind, muß parallel mit der Behandlung stets die bakteriologische Bestimmung der Blutaktivität an Standardkulturen von Staphylococcus oder Streptococcus ausgeführt werden. Das Mittel wird nach intravenöser oder intramuskulärer Injektion sehr rasch im Urin ausgeschieden, und der Blutspiegel bleibt nur kurze Zeit auf bakterio-statischer Höhe. Nach subcutaner oder intracavitärer Injektion bleibt Penicillin längere Zeit im Körper. Durch Eingabe per os oder rektal läßt sich keine nennenswerte Aktivität im Blut herstellen, wahrscheinlich weil das Mittel durch die Magensäure bzw. durch die Colibakterien des Darms zerstört wird. In besonders hohen Konzentrationen läßt es sich in der Galle nachweisen. Bakterienstämme, die durch Gewöhnung penicillin-resistent gemacht wurden, waren besonders empfindlich gegen Sulfonamide. Umgekehrt wurden keine sulfonamid-resistenten Stämme beobachtet, die nicht auf Penicillin ansprachen.

Von 91 Patienten mit Staphylococcus aureus-Infektionen und Bakteriämie wurden 54 nahezu vollständig geheilt, während von 137 Fällen ohne Bakteriämie 109 zur Heilung kamen. — Von 32 Streptococceninfektionen wurden 17 geheilt. — Bei Pneumococceninfektionen genügten 100 000 Einheiten in 2–3 Tagen, um Bakterienfreiheit zu erzielen. — Endocarditis und Meningitis sprachen schlecht an. — Gonococci sind sehr empfindlich gegen Penicillin. Von 129 sulfonamid-resistenten Fällen wurden 125 Heilungen erzielt. In 9–49 h waren die Patienten bakterienfrei, wobei alle 3 h 10 000–25 000 Einheiten injiziert wurden. — Penicillin ist sehr wenig toxisch. In einigen Fällen trat Urticaria auf, die aber nach Gabe von Nebennierenrindenhormon schnell abheilte<sup>120)</sup>.

### Biogenes Wasserstoffperoxyd.

Das einfachste antibakteriell wirksame Stoffwechselprodukt zahlreicher Mikroorganismen ist das Wasserstoffperoxyd. Es entsteht überall da, wo die gelben Fermente im Stoffwechsel der Kohlenhydrate und Eiweißstoffe eingreifen. Obwohl es ein allgemeines Zellgift ist, zeigen die verschiedenen Bakterienarten doch eine sehr verschiedene Empfindlichkeit. Dies zeigte zuerst Traugott<sup>121)</sup>. Etwas später wurde auch die antibakterielle Wirkung verschiedener anderer Peroxyde gegenüber zahlreichen Bakterienarten untersucht<sup>122)</sup> und mit der Wirkung von Hydroperoxyd verglichen. Im Jahre 1923 schlugen J. W. McLeod u. J. Gordon<sup>123)</sup> eine Gruppierung der Bakterien nach ihrer Empfindlichkeit gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vor. Sie testeten verschiedene Organismen auf Bouillon-Agar-Platten und fanden ebenfalls die gerade total hemmende Konzentration an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei den einzelnen Arten sehr verschieden (Tab. 3). Die Werte der Tabelle 3 wurden in Gegenwart von Pepton erhalten. Nach A. Lwoff u. H. Morel<sup>124)</sup> bewirkt dies ebenso wie Cystein eine starke Minderung der Wirksamkeit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Proteus vulgaris* wurde in synthetischem Medium schon mit 1 : 4 Mio. gehemmt, während in Peptonwasser die total hemmende Konzentration bei 1 : 400 000 lag.

Bakterien, die starke H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produzenten und wenig empfindlich gegen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sind, gehören einem besonderen Stoff-

Bakterienart	Total hemmende Konz. von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in % der Bouillon-Agar-Nährb.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion	Katalase-Produktion	Weitere sich ähnlich verhaltende Organismen
<i>B. tetani</i> .....(a)	0,00033	++++	—	Die Anaerobier <i>B. chauvæi</i> <i>B. sporogenes</i>
.....(b)	0,00027	++++	—	
<i>V. septique</i> .....	0,00043	++++	—	
<i>B. welchii</i> .....(a)	0,00032	++++	—	
.....(b)	0,00040	++++	—	
<i>Streptococcus hæmolyticus</i> .....(a)	0,0085	+++	—	Viele Streptococci Milchsäure-Bacillen Gewisse Sarcinen
.....(b)	0,0085	+++	—	
<i>B. acidophilus</i> .....(a)	0,0027	+++	—	
.....(b)	0,0050	+++	—	
<i>Pneumococcus</i> .....	0,02	+++	—	
<i>Streptococcus hæmolyticus</i> .....	0,0085	—	—	Dysenteriebacillen (Shigatyp), gew. Streptococci und Pfeifferähn. B.
<i>Shiga</i> .....(a)	0,006	—	—	
.....(b)	0,005	—	—	
.....(c)	0,0035	—	—	
<i>Vibrio cholerae</i> .....	0,00069	—	+	
<i>B. typhosus</i> .....	0,0062	—	++	<i>B. paratyphosus</i> A <i>B. mallei</i> , Dysenterie (Flexner, B. Pfeiffer)
<i>B. influenzae</i> .....(a)	0,0033	—	++	
.....(b)	0,0050	—	++	
.....				
<i>B. diphtheriae</i> .....(a)	0,0017	—	+++	Versch. Sarcinae
.....(b)	0,0030	—	+++	
<i>B. coli</i> .....(a)	0,0035	—	+++	
.....(b)	0,0042	—	+++	
<i>B. paratyphosus</i> B.....	0,0032	—	+++	Dysenterie Y <i>B. proteus</i> versch. Bodenbak- terien, Hefe aus Naso- pharynx
<i>Staph. aureus</i> .....(a)	0,0044	—	+++	
.....(b)	0,0037	—	+++	
<i>B. subtilis</i> .....	0,015	—	+++	
<i>B. Hofmann</i> .....	< 0,006	—	++++	
<i>B. prodigiosus</i> .....	0,0085	—	++++	

Tabelle 3.

wechseltyp an, sie stehen alle den Milchsäure-Bakterien nahe<sup>125)</sup>. F. M. Burnit<sup>126)</sup> konnte außerdem zeigen, daß bei verschiedenen Bakterienarten die Empfindlichkeit gegen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> parallel geht mit der Empfindlichkeit gegen Kaliumcyanid (Tab. 4).

Organismus	Total hemmende Konzentration von	
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	KCN
<i>Streptococcus acidilactici</i> .....	0,01%	1,2%
<i>Enterococcus</i> .....	0,008%	1,0%
<i>B. coli</i> .....	0,003%	0,1%
Dysenterie (Shiga).....	0,001%	0,02%

Tabelle 4.

Empfindlichkeit verschiedener Bakterien gegen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und KCN.

Die gegen KCN und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wenig empfindlichen Bakterien sind stark katalaseaktiv. Bei kräftiger Einsaat derartiger Bakterien auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-haltigen Agarplatten bildete sich eine Zone um das Inoculum, wo nunmehr auch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-empfindliche Bakterien kräftig wuchsen. Umgekehrt wurden durch starke H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildner gleichzeitig eingepfropfte andere Bakterien im Wachstum behindert. Es traten ausgesprochene bakterienfreie Höfe auf. Eine große Zahl der syn- und antibiotischen Effekte im Reiche der Mikroorganismen wird sich wahrscheinlich auf die Entfernung bzw. Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zurückführen lassen.

Ob ein Organismus einen anderen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-empfindlichen durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vergiften kann, hängt erstens davon ab, wie aktiv seine „gelbe Atmung“ ist und zweitens, wie aktiv seine Katalase ist, d. h. ob er überhaupt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> an das Nährmedium abgibt.

Im allg. sind strikte Anaerobier besonders empfindlich gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Das eigentlich Giftige der aeroben Bedingungen ist das Wasserstoffperoxyd, welches sie in Gegenwart von Sauerstoff bilden, da sie selbst keine Katalase produzieren. Wächst aber gleichzeitig mit ihnen ein katalasebildender Organismus, so werden sie durch ihn im Wachstum gefördert, ja es kann sein, daß die strikten Anaerobier auch unter aeroben Bedingungen zu wachsen vermögen (s. S. 166).

Aus diesem Grund stellen die weder mit Sulfonamiden noch mit Penicillin bisher wirksam zu bekämpfenden Wundinfektionen mit *Proteus vulgaris* und *Ps. pyocyanea* ein besonders dringendes ungelöstes Problem dar.

Wir können annehmen, daß das biogene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i. allg. bei der Autoxydation der hydrierten Stufe der Flavine-Enzyme der Zellen gebildet wird. Neben der Autoxydation der Flavine-Enzyme kommen aber auch noch andere Autoxydationsvorgänge für die Lieferung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Frage. So konnte

<sup>125)</sup> S. Orla-Jensen: Die Milchsäurebakterien, Kopenhagen 1919 und 1943.

<sup>126)</sup> J. Pathol. Bacteriology 30, 21 [1927].

<sup>119)</sup> J. Amer. med. Assoc. 122, 18; 1217 [1943].

<sup>120)</sup> Anm. b. d. Korr.: Nunmehr liegt ein weiterer eingehender Bericht über die klinischen Ergebnisse mit Penicillin vor, der auch neuere amerikanische Literatur enthält: G. Rieben, Schweiz. med. Wschr. 74, 625 [1944].

<sup>121)</sup> Z. Hyg. Infekt.-Krankh. 14, 427 [1893].

<sup>122)</sup> P. C. Feer u. F. G. Novy, Amer. Chem. J. 27, 161 [1902].

<sup>123)</sup> J. Pathol. Bacteriology 26, 326 [1923].

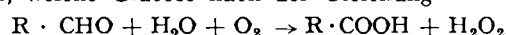
<sup>124)</sup> Ann. Inst. Pasteur 68, 323 [1942].



Lwoff<sup>127)</sup> die antibakterielle Wirksamkeit von Ascorbinsäure vollkommen auf das Wasserstoffperoxyd zurückführen, welches bei ihrer Autoxydation entsteht. Ähnliche Mechanismen sind denkbar in jenen Fällen, wo autoxydable Redoxfarbstoffe als antibakteriell beschrieben werden<sup>128)</sup>.

Neben den eigentlichen gelben Fermenten, die aus Hefe und Milchsäure-Bacillen<sup>129)</sup> dargestellt wurden, hat man aus Schimmelpilzen ein spezielles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-bildendes Ferment gewonnen, das Glucose zu Gluconsäure und Wasserstoffperoxyd vergärt<sup>130)</sup>. Auch dieses Ferment wurde als Flavin-Enzym erkannt<sup>131)</sup>. Seinen antibakteriellen Eigenschaften, die es der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung verdankt, wurde aber erst in jüngster Zeit die Aufmerksamkeit zugewandt. Müller und Franke haben die Glucoseoxydase durch Extraktion des Mycels von *Aspergillus niger* bzw. *Penicillium glaucum* dargestellt. Hierbei gingen aber auch erhebliche Mengen Katalase mit in die Lösung, die nur sehr schwer zu entfernen sind.

Um ganz katalasefreie und daher antibakteriell wirksame Präparate zu bekommen, scheint es günstiger, die Nährlösung zu verarbeiten, wenn der Pilz längere Zeit darauf gewachsen ist. Auf diesem Weg hat eine englische Forschergruppe<sup>132)</sup> aus *P. notatum* Westling, dem gleichen Pilz, welcher Penicillin produziert, eine Glucoseoxydase vom Reinheitsgrad 0,9 dargestellt, welche Glucose nach der Gleichung



oxydiert. Die Reinigung erfolgte über die Tannin-Verbindung, aus welcher das Tannin mittels Aceton extrahiert wurde. Die englischen Autoren haben der Glucoseoxydase aus *P. notatum* den Namen „Notatin“ gegeben. Gemäß der Gleichung kann Notatin seine antibakterielle Wirkung nur unter bestimmten Bedingungen ausüben. Diese sind: 1. Anwesenheit von Glucose, 2. Anwesenheit von Sauerstoff, 3. Abwesenheit nennenswerter Mengen von Katalase.

Um das gleiche Enzym handelt es sich offenbar bei dem „Penatin“ *W. Kocholatys*<sup>133)</sup> und dem „Penicillin B“ einer amerikanischen Forschergruppe<sup>134)</sup>. Die Darstellung eines glucose-oxydierenden Enzyms mit bakteriostatischer Wirkung berichtet ferner J. Hirsch<sup>135)</sup>. Er isolierte das Ferment aus einem Pilz, den er *P. notatum* Fleming nennt, zum Unterschied von *P. notatum* Westling, welches Penicillin produziert.

Die einfachste Reinigungsmethode scheint die Fällung des Enzyms aus der rohen Kulturlösung mit Uranylacetat zu sein. Da die prosthetische Gruppe des Enzyms ein unlösliches Silber-Salz liefert, ist es wahrscheinlich ein Dinucleotid.

Wenn das reine Notatin, wie man nach den Angaben der englischen Autoren annehmen muß, tatsächlich einen so hohen Reinheitsgrad aufweist und frei von Cozymase ist, muß es als sehr bemerkenswert erscheinen, daß ein gelbes Ferment den Wasserstoff direkt ohne Dazwischenschaltung eines anderen Überträgers von einem Aldehyd (Glucose) auf den molekularen Sauerstoff überträgt. Es erscheint daher nicht ausgeschlossen, daß die Reindarstellung des Coferments der Glucoseoxydase noch eine Überraschung zutage fördert<sup>136)</sup>.

Das reinste Notatin der englischen Autoren, welches auf Grund der Extinktion der Flavin-Bande 90%ig ist, hemmt Staphylococcen noch in einer Verdünnung von 1 : 1 Milliarde. Auch zahlreiche andere Bakterien zeigten sich als hochempfindlich.

Das Penicillin B der Amerikaner war nur 60%ig, hemmte aber noch in der Verdünnung von 1 : 6 Milliarden. Die Unterschiede in der Wirksamkeit mögen auf den verschiedenen Katalase-Gehalt der zum Test benutzten Stämme zurückzuführen sein.

Für therapeutische Zwecke scheint die Anwendung der Glucoseoxydase nur wenig aussichtsreich, da im höheren Organismus allenthalben Katalase in großen Mengen anwesend ist.

Eine Möglichkeit, trotz Anwesenheit von Katalase Bakterien durch Glucoseoxydase zu hemmen, ergibt sich daraus, daß es gelingt, Katalase vollständig zu hemmen durch Natriumazid oder Kaliumcyanid in Konzentrationen, die an sich noch

keine Wachstumshemmung der Bakterien bewirken. Natriumazid hemmt unseren Staphylococcus v. R. erst in einer Konzentration von  $7 \cdot 10^{-2}$  merklich. Katalase wird aber schon mit  $10^{-4}$  vollkommen blockiert. Daher zeigte eine Schimmekulturlösung, die neben Glucoseoxydase noch Katalase enthielt und daher bakteriostatisch unwirksam war, starke bakteriostatische Wirkung, wenn man sie mit Azid in einer Verdünnung von  $10^{-4}$  versetzte.

Ob die antibakterielle Wirksamkeit einer Schimmelpilzkultur auf der Ausscheidung von Penicillin oder Notatin beruht, läßt sich feststellen, wenn man die Glucoseoxydase- und Katalase-Aktivität der Lösung bestimmt. Dabei zeigte sich bei dem Stamm von *Penicillium notatum* Westling aus der Sammlung Baarn, den wir in Händen hatten, daß die Kulturlösung immer zuerst oxydatisch und schon sehr kurz darauf katalatisch aktiv wurde. Parallel damit gingen Auftreten und Verschwinden der antibakteriellen Aktivität<sup>137)</sup>. Wahrscheinlich genügen schon minimale Mengen Katalase, um die Wirkung zum Verschwinden zu bringen. Die gelben Fermente haben nach den Untersuchungen Warburgs<sup>138)</sup> Wechselzahlen in der Größenordnung von 30 je min, während Katalase nach den Untersuchungen von R. Kuhn<sup>139)</sup> eine solche von 100 000 je s besitzt. In der Nährlösung müssen also mehr als 200 000 Molekeln Glucoseoxydase je Molekel Katalase enthalten sein, damit überhaupt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auftreten kann. Auch von der Katalase-Aktivität des Testorganismus hängt die Wirksamkeit ab. Daraus ergibt sich die verschiedene Ansprechbarkeit verschiedener Organismen.

Einen ebenfalls hochmolekularen, hochaktiven Hemmstoff für Staphylococcen haben französische Forscher<sup>140)</sup> aus dem Filtrat einer Pilzkultur isoliert, die sie aus Spanien erhalten hatten und die ursprünglich von einer *Penicillium notatum*-Kultur des Listerinstitutes stammte. Der Pilz wurde vom Centralbureau Baarn als *Penicillium Corylophyllum* Dx. gekennzeichnet. Der Wirkstoff, das Corylophyllin, wurde durch Adsorption an geeignete Mittel und spezifische Elution ohne Wirksamkeitsverlust bis zur Wirksamkeit von  $10^{-8}$  bis  $10^{-9}$  angereichert. Die Substanz stellt ein schwach gelblich gefärbtes Pulver dar und verliert durch Dialyse nicht an Wirksamkeit. Über den Wirkungsmechanismus des Stoffes und seine Beziehungen zum Notatin liegen keine Angaben vor.

## Die Chinone als Hemmstoffe.

Zwischen den eben beschriebenen Stoffen Penicillin und Notatin, die entsprechend ihrer hohen Wirksamkeit nur in sehr geringer Menge im Nährmedium auftreten, und den erst in sehr hoher Konzentration bakteriostatisch wirksamen Stoffwechselprodukten wie Milchsäure, Bernsteinsäure, Citronensäure, Itaconsäure steht eine Gruppe von Stoffen, die in mittleren Konzentrationen von 1 : 10 000 bis 1 : 100 000 das Wachstum verschiedener Bakterien hemmen. Diese fallen als Stoffwechselprodukte von niederen Pilzen aber in solchen Mengen an, daß sie ebenfalls als antibiotische Wirkstoffe anzusprechen sind. Immerhin ist ihre Konzentration im Nährmedium so groß, daß sie meist früher entdeckt und in ihrer Konstitution aufgeklärt wurden, als ihre bakteriostatische Wirksamkeit erkannt wurde. Viele von den schon beschriebenen Stoffwechselprodukten sind noch nicht auf antibiotische Wirkung untersucht. Es ist zu erwarten, daß sich unter ihnen noch weitere wirksame Verbindungen befinden.

**Benzochinone.** Aus dem gebrauchten Kulturmedium von *Aspergillus fumigatus* isolierten W. K. Anslow u. H. Raistrick<sup>141)</sup> ein Chinon vom F. 116°, dem sie die Konstitution eines 3-Oxy-4-methoxy-toluchinons (I) zuschrieben. W. Baker u. H. Raistrick<sup>142)</sup> konnten die Richtigkeit der Formel durch die Synthese bestätigen. In der Wirksamkeit nimmt Fumigatin unter den zahlreichen geprüften Benzochinon-Derivaten eine mittlere Stellung ein (Tab. 5). Zu den am wenigsten wirksamen Benzochinonen gehört das Spinulosin, das 6-Oxy-fumigatin (II). Es wurde von H. Raistrick u. J. H. Birkinshaw<sup>143)</sup> als Stoffwechselprodukt von *P. spinulosum* Thom beschrieben. Seine Konstitution wurde von Anslow u. Raistrick bewiesen<sup>144)</sup>, die es auch als Produkt von einer Abart von *Aspergillus fumigatus* auffanden<sup>145)</sup>.

<sup>127)</sup> l. c. <sup>82)</sup>.

<sup>128)</sup> H. McIlwain, Nature [London] **148**, 628 [1941].

<sup>129)</sup> O. Warburg u. W. Christian, Biochem. Z. **260**, 499 [1933].

<sup>130)</sup> D. Müller, ebenda **199**, 136 [1928].

<sup>131)</sup> W. Franke u. F. Lorenz, Liebig's Ann. Chem. **532**, 1 [1937].

<sup>132)</sup> C. E. Coulthard, R. Michaelis, W. F. Short, G. Sykes, G. E. H. Skrimshire, A. F. B. Standfast, I. H. Birkinshaw u. H. Raistrick, Nature [London] **150**, 634 [1942].

<sup>133)</sup> Science **97**, 186 [1943]; J. Bacteriol. **44**, 143 [1942].

<sup>134)</sup> E. C. Roberts, C. K. Cain, R. D. Muir, F. J. Reithel, W. L. Gaby, J. T. Van Bruggen, D. M. Holman, P. A. Katzman, L. R. Jones u. E. A. Doisy, J. biol. Chemistry **147**, 47 [1943]; **148**, 365 [1943].

<sup>135)</sup> Istanbul Sciriya **25**, No. 8 [1943].

<sup>136)</sup> Man könnte sich z. B. vorstellen, daß das Ferment ein Alloxazinpyridinnucleotid ist, welches den Wasserstoff intramolekular zu verschieben vermag.

<sup>137)</sup> Nach Versuchen mit A. Gauhe.

<sup>138)</sup> O. Warburg u. W. Christian, Biol. Zbl. **266**, 377 [1933].

<sup>139)</sup> R. Kuhn, D. B. Hand u. M. Florkin, Naturwiss. **19**, 771 [1931].

<sup>140)</sup> H. Péneau, C. Leudali u. G. Hagemann, Bull. Soc. Chim. biol. **25**, 406 [1943].

<sup>141)</sup> Biochemic. J. **32**, 687 [1938].

<sup>142)</sup> J. chem. Soc. [London] **1941**, 670.

<sup>143)</sup> Philos. Trans. Roy. Soc. London Ser. B. **220**, 245 [1931].

<sup>144)</sup> Biochemic. J. **32**, 803 [1938].

<sup>145)</sup> Ebenda **32**, 2288 [1938].

Benzochinon-Derivat	Staphylococcus aureus No. 3750	
	1 Tag (1 Teil in)	2 Tage
p-Benzochinon	12 000	12 000
Toluchinon	10 000	10 000
Methoxychinon	12 000	12 000
4-Oxy-toluchinon	33 000	12 000
4-Methoxy-toluchinon	400 000	200 000
3-Methoxy-toluchinon	20 000	10 000
2,5-Dioxy-benzochinon	< 10 000	
2,5-Dimethoxy-benzochinon	100 000	50 000
2,6-Dimethoxy-benzochinon	270 000	48 000
3,6-Dioxy-toluchinon	17 000	10 000
3,6-Dimethoxy-toluchinon	> 100 000	40 000
4,6-Dioxy-toluchinon	< 10 000	
4-Oxy-6-methoxy-toluchinon	10 000	< 10 000
6-Oxy-4-methoxy-toluchinon	150 000	100 000
4,6-Dimethoxy-toluchinon	600 000	300 000
3-Oxy-4-methoxy-toluchinon (Fumigatin)	30 000	20 000
	—100 000	—50 000
3,6-Dioxy-4-methoxy-toluchinon (Spinulosin)	6 000	< 6 000
Trimethoxy-toluchinon (Spinulosin-trimethyläther)	> 400 000	200 000

Tabelle 5.

Totalhemmende Konzentration  
verschiedener Benzochinon-Derivate in Glucose-Peptonwasser<sup>146)</sup>.

Bei der Kultur von *Pseudomonas Beijerinckii* auf einer Bohnenextrakt-Nährlösung beobachteten A. J. Kluyver, T. Hof u. A. G. J. Boezaard<sup>147)</sup> die Bildung eines roten Pigmentes, welches sie als Tetraoxy-benzochinon (III) identifizieren konnten. Das Bakterium bildet das gleiche Pigment auch in synthetischem Medium bei Zusatz von Inosit, welcher zum Chinon dehydriert wird. Wahrscheinlich hat das Tetraoxybenzochinon keine antibakterielle Wirkung, seine Entstehung gibt jedoch einen Fingerzeig, auf welchem Weg die Benzochinone in den Organismen gebildet werden können.

Neben diesen Chinonen ist noch eine Anzahl von Hydrochinonen mit charakteristischen Seitenketten aus dem Mycel einer Reihe von Pilzen der *Aspergillus glaucus*-Serie isoliert worden, doch ist über ihre antibakterielle Wirksamkeit und die der zugehörigen Chinone nichts bekannt<sup>148, 149, 150)</sup>.

Folgende Beziehungen zwischen Konstitution und Wirksamkeit der Benzochinone lassen sich aus der Tabelle 5 ableiten: 1. Die Einführung von OCH<sub>3</sub> in den Chinon-Kern hat oft einen bedeutenden Anstieg der antibakteriellen Wirksamkeit zur Folge. 2. Die Einführung von Hydroxyl bewirkt meist einen Abfall der Wirksamkeit. 3. Der Ersatz von Hydroxyl durch Methoxyl bringt stets einen bedeutenden Wirksamkeitsanstieg mit sich. 4. Die meisten der hochwirksamen Chinone sind Derivate von 4-Methoxy-toluchinon oder Dimethoxychinone.

**Naphthochinone** wurden bisher noch nicht als Stoffwechselprodukte von Pilzen beobachtet. Sie kommen lediglich in gewissen Bakterienarten, höheren Pflanzen und im Tierreich bei den Echinodermen vor. Ihre bakteriostatische Wirksamkeit ist nach unseren Versuchen z. T. bedeutend größer als die der Benzochinone (Tab. 6).

Naphthochinon-Derivat	Staphylococcus aureus Sg	
	2 Tage (1 Teil in)	4 Tage
2-Oxy-naphthochinon	31 000	31 000
	—125 000	—125 000
2-Methoxy-naphthochinon	< 15 000	< 15 000
5-Oxy-naphthochinon	250 000	250 000
2-Methyl-naphthochinon	59 000	< 59 000
2-Chlor-naphthochinon	250 000	250 000
2-Oxy-3-methoxy-naphthochinon	30 000	< 15 000
2,3-Dimethoxy-naphthochinon	4 000 000	1 000 000
2-Methyl-3-oxo-naphthochinon	< 59 000	< 59 000
2-Methyl-3-methoxy-naphthochinon	1 000 000	250 000
2-Äthyl-3-brom-naphthochinon	125 000	59 000
2-Methyl-5,8-dioxy-naphthochinon	7 700 000	2 000 000
2-Methoxy-5,8-dioxy-naphthochinon	1 000 000	250 000
2-Äthyl-3,5,8-trioxy-naphthochinon	125 000	< 15 000
2-Äthyl-3-methoxy-5,8-dioxy-naphthochinon	1 000 000	250 000
Shikonin	2 000 000	1—2 000 000
2-Brom-5,8-dioxy-naphthochinon	125 000	31 000
2-Äthyl-3-methoxy-5,7,8-trioxy-naphthochinon	125 000	31 000
2-Äthyl-3,7-dimethoxy-5,8-dioxy-naphthochinon	500 000	62 000
1,2-Naphthochinon	125 000	15 000
Fumigatin	59 000	< 59 000
	—500 000	

Tabelle 6.

Totalhemmende Konzentrationen  
verschiedener Naphthochinon-Derivate (synth. Medium)\*).

Wir finden sehr ähnliche Beziehungen zwischen Konstitution und Wirkung wie bei den Benzochinonen, so daß man auf den gleichen Wirkungsmechanismus schließen darf.

<sup>146)</sup> Enzymologia [Den Haag] 7, 257 [1939].

<sup>147)</sup> A. E. Oxford, Chem. Industry 61, 189 [1942].

<sup>148)</sup> B. S. Gould u. H. Raistrick, Biochem. J. 28, 1640 [1934].

<sup>149)</sup> H. Raistrick, R. Robinson u. A. R. Todd, J. chem. Soc. [London] 1937, 80.

<sup>150)</sup> J. H. Cruickshank, H. Raistrick, R. Robinson, ebenda 1938, 2056.

\*) Herrn Dr. E. F. Moeller danke ich sehr für die Prüfung der Naphthochinone auf antibakterielle Wirkung.

Über die antibakterielle Wirksamkeit der Anthrachinone, von denen eine große Anzahl aus Schimmel- und anderen Pilzen isoliert werden konnte, liegen noch keine Beobachtungen vor.

Einen den Chinonen nahestehenden Molekelbau weist das Citrinin<sup>151)</sup> (IV) auf, welches von *P. citrinum* Thom in erheblicher Menge produziert wird<sup>152)</sup>. Aus 1 l Kulturlösung erhält man aus 50 g Glucose 2,2 g des orange-gelben kristallisierten Citrinins<sup>153)</sup>, welches in einer Verdünnung von 1 : 50 000 bis 1 : 100 000 verschiedene grampositive und -negative Bakterien hemmt<sup>154)</sup>.

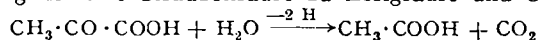
**Mechanismus der Chinon-Hemmung.** Für den Mechanismus der wachstumshemmenden Wirkung der Chinone kann man noch keine sichere Begründung angeben. Die Versuche von R. Kuhn u. H. Beinert<sup>155)</sup>, welche eine spezifische Hemmung der Carboxylase durch p-Benzochinon nachweisen konnten, weisen vielleicht den richtigen Weg. Beim Test der verschiedenen uns zur Verfügung stehenden Naphthochinone auf Carboxylasehemmung fanden sie<sup>156)</sup> teilweise bedeutend größere Wirksamkeiten als beim Benzochinon (Tab. 7).

Chinon	Hemmung der CO <sub>2</sub> -Entwicklung (in Prozent)/8 min bei verschieden molarer Konzentration des Hemmstoffs		
	0,94 · 10 <sup>-6</sup>	3,75 · 10 <sup>-6</sup>	1,5 · 10 <sup>-4</sup>
p-Benzochinon	40	85	95
Toluchinon	36	83	—
2,6-Dimethoxy-benzochinon	—	—	41
3-Oxy-4-methoxy-toluchinon	—	14	21
2-Oxy-naphthochinon	—	—	5
2-Methoxy-naphthochinon	—	—	37
5-Oxy-naphthochinon	67	87	95
2-Methyl-naphthochinon	—	32	68
2-Chlor-naphthochinon	89	94	97
2-Oxy-3-methyl-naphthochinon	—	—	4
2-Methoxy-3-methyl-naphthochinon	—	—	56
2-Äthyl-3-brom-naphthochinon	74	87	—
2-Methyl-5,8-dioxy-naphthochinon	87	93	—
2,5,8-Trioxynaphthochinon	—	13	33
2-Methoxy-5,8-dioxy-naphthochinon	51	80	89
2-Äthyl-3,5,8-trioxy-naphthochinon	—	17	35
2-Äthyl-3-methoxy-5,8-dioxy-naphthochinon	78	90	—
Shikonin	83	92	—
2-Brom-5,8-dioxy-naphthochinon	90	98	—
2-Äthyl-3-methoxy-5,7,8-trioxy-naphthochinon	58	82	—
1,2-Naphthochinon	—	84	95

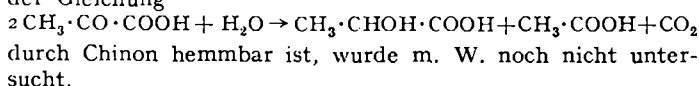
Tabelle 7. Carboxylase-Hemmung durch Chinone.

Am wirksamsten erwiesen sich Methylnaphthazarin und die Halogen-naphthochinone. Einführung von Hydroxyl-Gruppen in die Ortho-Stellung zum Carbonyl hatte einen starken Abfall der Wirksamkeit zur Folge (Naphthopurpurin)! Die Methylierung der Hydroxyl-Gruppe in Position 2 bewirkte wieder einen Anstieg. Diese Regeln stimmen aber so weitgehend mit den bei dem Wachstumshemmungstest beobachteten überein, wie man sie nur bei so verschiedenartigen Bedingungen erwarten kann, wenn man das Wachstum von Zellen und die Wirksamkeit einer hochgereinigten Fermentlösung vergleicht. Es erscheint danach sehr wahrscheinlich, daß die Wachstumshemmung durch die Chinone auf die Hemmung der Carboxylase oder anderer chinon-empfindlicher Fermente zurückgeht.

Als ein solches kommt besonders bei bestimmten Bakterien ein anderes den Brenztraubensäure-Umsatz steuerndes Ferment in Frage, welches in Gonococcen, Staphylococcen und Streptococcen nachgewiesen wurde<sup>157)</sup>. Dieses Ferment, die α-Ketonoxydase (Pyruvodehydrase), katalysiert die dehydrierende Spaltung der Brenztraubensäure zu Essigsäure und CO<sub>2</sub>:



Es ist hochgradig chinon-empfindlich. Die Konzentration 1 · 10<sup>-5</sup> hemmt den Brenztraubensäure-Umsatz durch Gonococcen zu 37 %, 3 · 10<sup>-5</sup> zu 96 %. Da das Coferment der Pyruvodehydrase wie bei der Carboxylase Aneurinpyrophosphat zu sein scheint<sup>158, 159)</sup>, ist es denkbar, daß die Hemmung durch Chinon auf die gleiche Ursache zurückzuführen ist. Ob auch der dismutierende Abbau der Brenztraubensäure<sup>160)</sup> nach der Gleichung



<sup>151)</sup> Coyne, Raistrick u. Robinson, Philos. Trans. Roy. Soc. London, Ser. B220, 297 [1931].

<sup>152)</sup> Hetherington u. H. Raistrick, ebenda 220, 269 [1931].

<sup>153)</sup> H. Raistrick u. G. Smith, Chem. Industry 60, 828 [1941].

<sup>154)</sup> A. E. Oxford, ebenda 61, 48 [1942]. <sup>155)</sup> Ber. Dtsch. Chem. Ges. 76, 904 (1943).

<sup>156)</sup> Unveröffentlicht.

<sup>157)</sup> E. S. G. Barron u. Miller, J. biol. Chemistry 97, 691 [1932]; E. S. G. Barron, ebenda 113, 695 [1936]; E. S. G. Barron u. Lyman, ebenda 127, 143 [1938].

<sup>158)</sup> F. Lipmann, Enzymologia [Den Haag] 4, 65 [1937]; J. biol. Chemistry 134, 463 [1940]. <sup>159)</sup> G. M. Hills, Biochem. J. 32, 383 [1938].

<sup>160)</sup> H. A. Krebs, ebenda 31, 661 [1937].

Auch auf Urease wirkt Chinon stark hemmend<sup>181)</sup>. In einer Verdünnung von 1 : 5 Mio. hemmt es das Ferment zu 60%. In der oben zitierten Arbeit<sup>34)</sup> über die Kultur von Pansenorganismen auf Harnstoff-Stärke-Nährböden wurde die Wirkung von p-Benzochinon auf die Protein-Synthese durch den Panseninhalt, d. h. auf das Wachstum der Pansen-Bakterien untersucht. Bei einer Konzentration von 0,001% Chinon war die Synthese schon merklich geringer geworden, bei 0,05% Chinon überwog bereits der Protein-Abbau. Durch H<sub>2</sub>S ließ sich die Chinon-Wirkung wie beim isolierten Enzym vollständig aufheben.

Man nimmt an, daß die Wirkung des Chinons auf Urease darauf beruht, daß bestimmte SH-Gruppen des Enzyms dehydriert werden. Auch für die Carboxylase und Pyruvodehydrase ist dieser Wirkungsmechanismus wahrscheinlich. Man wird zu prüfen haben, ob nicht auch das Penicillin, welches ja ebenfalls auf Urease hemmend wirkt <sup>90)</sup>, in ähnlicher Weise wie die Chinone in den Abbau der Brenztraubensäure eingreift, welche ja im Stoffwechsel eine besonders wichtige Stelle einnimmt. Da dem Penicillamin, dem einzigen bisher kristallisiert erhaltenen Abbauprodukt des Penicillins, ascorbinsäure-ähnliche Eigenschaften zugeschrieben werden <sup>94)</sup>, erscheint dies nicht unwahrscheinlich.

## Salicylsäure.

Zu den ersten Stoffwechselprodukten von Pilzen, die als wachstumshemmend für andere Organismen erkannt wurden, gehört das Sparassol, der Everminsäuremethylester (V). In Reinkulturen des Ziegenbartes *Sparassis ramosa* tritt es in beträchtlicher Menge auf und kristallisiert darin in manchmal zentimeterlangen Spießen. Nach R. Falck<sup>162)</sup> schützt das Sparassol die Kulturen vor Verunreinigung durch fremde Organismen, da dem reinen Stoff eine erhebliche mycocide Wirkung zukommt. Zahlenmäßige Angaben über die Wirksamkeit des Sparassols liegen m. W. nicht vor. Die gleiche Substanz läßt sich aus der Flechte *Evernia prunastri* durch Kochen mit Methylalkohol oder auch fermentativ aus der Flechtensäure mit Takadiastase gewinnen<sup>163)</sup>.

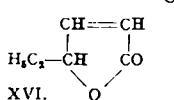
Ein anderes Derivat der Salicylsäure wird von *P. griseofulvum* produziert<sup>164</sup>). Es wurde als 6-Methyl-salicylsäure (VI) erkannt. Von dieser Verbindung wird keine Wirksamkeit angegeben. Es ist anzunehmen, daß sie eine ähnliche Wirksamkeit hat wie die Stammsubstanz, die Salicylsäure, und wie der Methylester des 4-Methoxy-Derivates, das Sparassol.

Außer den genannten Salicylsäure-Derivaten wurden noch folgende Oxybenzoesäure-Abkömmlinge in Kulturlösungen von verschiedenen Pilzen aufgefunden: 2,5-Dioxy-benzoesäure und 3,5-Dioxy-phthalsäure in Penicillien<sup>165</sup>, das Mellein, ein Lacton der 6-Oxy-2-( $\alpha$ -oxy-propyl)-benzoesäure<sup>166</sup> (VII), aus *Aspergillus melleus* und Mycophenolsäure<sup>167</sup> (VIII) aus *P. stoloniferum*.

**Mechanismus der Salicylsäure-Hemmung.** Nach G. Ivanovics<sup>169)</sup> läßt sich die Wachstums-  
hemmung durch Salicylsäure bei B. coli und Staphylococcen,  
die an sich Pantothensäure nicht benötigen, aufheben, wenn  
man Pantothensäure zusetzt. Von den beiden Bausteinen der  
Pantothensäure hebt auch das  $\alpha,\gamma$ -Dioxy- $\beta$ ,  $\beta$ -dimethyl-but-  
tersäurelacton die Salicylsäure-Hemmung auf, während  $\beta$ -Alanin  
keinen Einfluß hat. Bei der Hemmung durch Salicylsäure  
soll es sich nicht um einen Verdrängungsmechanismus handeln,  
wie er bei den Konkurrenten Sulfanilamid-p-Amino-benzoe-  
säure besteht, sondern um die Vergiftung der Synthese des  
Lacton-Teiles des Vitamins. Ob die Hemmung des Wachstums  
von Schimmelpilzen auf dem gleichen Wirkprinzip beruht, ist  
nicht bekannt.

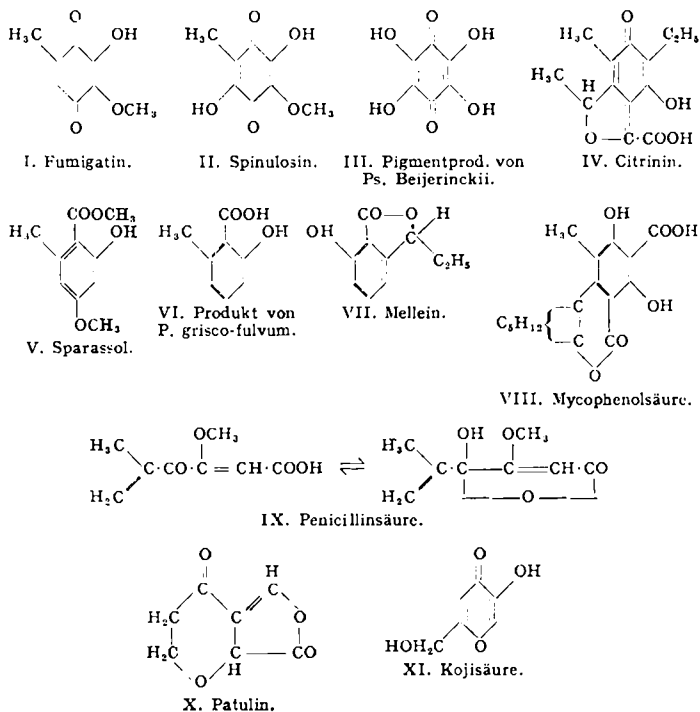
**Lactone.**

Nach R. Kuhn u. Mitarbeitern<sup>169)</sup> kommt einer Anzahl von ungesättigten Lactonen, die in Samen und Früchten bestimmter Pflanzen vorkommen, die Bedeutung zu, die Keimung zu hemmen. Die gleichen Stoffe hindern auch das Wachstum von



Bakterien. Parasorbinsäure (Formel XVI) aus dem flüchtigen Öl der reifen Vogelbeeren hemmt Staphylococcen und Hefe in Konzentrationen von  $10^{-3}$ – $10^{-4}$ . Auch unter wachstumshem-

menden Stoffwechselprodukten von Pilzen finden wir Lactone. Penicillinsäure, die in einer Verdünnung von 1 : 100 000 zahlreiche Organismen noch vollständig hemmt<sup>170)</sup>, ist nach C. L. Alsberg u. O. F. Black<sup>171)</sup> ein Stoffwechselprodukt von *P. puberulum*. Später fanden sie A. E. Oxford u. H. Raistrick<sup>172)</sup> auch in der Kulturlösung von *P. cyclopium* Westling. Birkinshaw, Oxford u. Raistrick<sup>173)</sup> klärten die Konstitution auf. Penicillinsäure ist ein  $\alpha,\beta$ -ungesättigtes Lacton (IX), das mit der offenen Form im Gleichgewicht steht. So wie die Parasorbinsäure bei der Hydrierung der  $\alpha,\beta$ -Doppelbindung ihre Wirksamkeit als Blastokolin einbüßt, ist auch die Dihydropenicillinsäure antibakteriell unwirksam.



### Stoffwechselprodukte von niederen Pilzen und Bakterien.

In neuester Zeit wurde von *Raistrick* u. Mitarbeitern<sup>174</sup>) aus der Kulturlösung von *P. patulum* Bainier eine Substanz isoliert, die das Wachstum von *Staph. aureus* mit 1 : 64 000 total, mit 1 : 128 000 partiell hemmt. Das neue Bakterio- statikum wird in relativ großer Menge gebildet. Die Filtrate der Kulturen enthalten etwa 1 g/l und hemmen *Staphylococci* noch bei einer Verdünnung von 1 : 100. Die reine Substanz der Bruttoformel  $C_7H_6O_4$  bildet farblose Prismen vom F. 111° und ist optisch inaktiv. Sie scheint eine Anhydro-3-oxy- methylen-tetrahydro-pyron-2-carbonsäure (X) zu sein, ist also ebenfalls ein ungesättigtes Lacton. Dem neuen Stoffwechsel- produkt wurde der Name „Patulin“ gegeben. Es soll sich vor- nehmlich zur Bekämpfung von Schnupfen eignen. Gegenüber dem ersten Stadium, das eine Virusinfektion darstellt, ist es wirkungslos. Aber die weiteren Superinfektionen des Nasen- rachenraumes sollen sehr günstig beeinflußt werden. Diese Behandlungserfolge werden jedoch nicht von allen Autoren bestätigt. 3 Truppenärzte machten bei etwa 100 Patienten im vergangenen August und September die Erfahrung, daß Patulin keinen sichtbaren Effekt auf den Verlauf der Erkrankung gehabt hat. — Serum und Eiter hindern nicht den bakteriostatischen Effekt von Patulin. Der ungesättigte Lacton-Ring im Patulin scheint für die Wirksamkeit wesent- lich zu sein, da Kojisäure, ein Stoffwechselprodukt verschiede- ner Pilze und Bakterien, ebenfalls ein  $\gamma$ -Pyron-Derivat ist (XI), jedoch keine antibakterielle Wirkung besitzt<sup>170</sup>). Auch Cheli- donsäure ( $\gamma$ -Pyron-dicarbonsäure) hat keinen Einfluß auf das Wachstum von *Staphylococci*<sup>178</sup>).

Patulin kommt nicht nur in *P. Patulum* sondern auch in anderen *Penicillium*- und *Aspergillus*arten vor. Dem in *P. claviforme* entdeckten und daraus isolierten „Claviformin“ wurde zwar zunächst die Bruttoformel  $C_6H_8O_5$  zugeschrieben<sup>176)</sup>.

<sup>161)</sup> J. H. Quastel, Biochemic. J. **27**, 1116 [1933].

<sup>162)</sup> Ber. deutsch. chem. Ges. **56**, 2555 [1923]

163) *Asahina* u. *Higuti*, ebenda **66**, 1959 [1933].

184) W. K. Anslow u. H. Raistrick, Biochemic. J. **25**, 39 [1931].

100) F. Nishikawa. J. agric. chem. Soc. Japan 9: 772-105.

<sup>167)</sup> C. L. Alsberg u. O. F. Black, U. S. Dep. Agricult. Bureau Plant.

<sup>168)</sup> Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **276**, 33 [1942].

<sup>109)</sup> R. Kuhn, D. Jerchel, F. Moewus, E. F. Möller, H. Lettré, Naturwiss. 31, 68 [1943]; s. a. R. Kuhn, diese Ztschr. 58, 236 [1943].

<sup>170)</sup> *A. E. Oxford*, Chem. Industry **61**, 48 [1942].

171) U. S. Dep. Agricult. Bureau Plant. Ind. Bull. No. 270 [1913].

<sup>172</sup> Biochemic. J. **29**, 599 [1935].

173) *Ebenda* **30**, 394 [1936].  
174) *Chem. Trade J.* Chem.

175) Eigene Versuche.

176) *Willkins u. Harr*

Heatley, Orr-Ewing u. Sanders, *Lancet* 1940 II, 226; *Crowfoot* u. *Low*, *ibenda* 1944 I, 113.

es ist aber, wie neuerdings gefunden wurde, mit Patulin und Clavatin aus *Aspergillus clavatus* identisch<sup>174)</sup>.

Patulin hemmt nicht nur das Wachstum von Bakterien. Es ist auch gegenüber bestimmten Pilzen wirksam. Eine Anzahl von Pythiumarten, die pathogen für Pflanzen sind, werden in der Konzentration 1 : 400 000 noch vollständig gehemmt<sup>177)</sup>.

Entsprechend seiner Konstitution als ungesättigtes Lacton hemmt Patulin auch die Keimung von Samen und das Wachstum der Wurzeln. Die Versuche wurden von Frl. E. Schader mit Samen der Gartenkresse (*Lepidium sativum*) ausgeführt<sup>178)</sup>. In Tab. 8 sind die Ergebnisse mit den bei Cumarin erhaltenen Werten zusammengestellt. Patulin gehört also zu den am besten wirksamen Blastokolinen, die wir bisher kennen.

Substanz	1 : 1000			1 : 10 000			1 : 100 000			1 : ∞	
	% Keimung	Wurzellänge	% Hemmung des Wurzelwachstums	% Keimung	Wurzellänge	% Hemmung des Wurzelwachstums	% Keimung	Wurzellänge	% Hemmung des Wurzelwachstums	% Keimung	Wurzellänge
Patulin.....	0	0	100	43	1,1	92	95	10,6	23	95	13,7
Cumarin.....	0	0	100	96	2,6	79	96	10,5	17	100	12,6

Tabelle 8.

### b) Bakterien gegen Bakterien.

Die bisher geschilderten antagonistischen Stoffe werden von Pilzen produziert. Die Erscheinung der Antibiose ist jedoch unter den Bakterien mindestens ebenso verbreitet wie bei den Pilzen. Fast sämtliche natürlichen Vorkommen von Bakterien stellen gemischte Populationen dar. Sei es nun, daß man die Flora des Bodens, des Wassers und des Abwassers untersucht oder daß man die Infektionsherde bei kranken Tieren oder Menschen wie in Wunden oder im Nasen-Rachenraum oder die Flora des Darmes des Säugetieres betrachtet, stets wird man ein Gemisch verschiedenartiger Bakterien vorfinden. Man findet aber nicht ein wahlloses Gemisch aller möglichen Arten, sondern meist bestimmte Gesellschaften, die für das betr. Vorkommen charakteristisch sind, und man beobachtet, daß gewisse Kombinationen niemals auftreten. Im Abschnitt über Symbiose wurde die Bedeutung der Gesellschaften für die biologische Leistung der Organismen dargelegt. Im folgenden soll ein Überblick über die bisher bekannten bakteriellen Antibiosen gegeben werden, deren stoffliche Grundlage jedoch erst in den wenigsten Fällen erkannt wurde.

### Chromobakterien.

Außerordentlich zahlreich sind die Beobachtungen über den Antagonismus von verschiedenen Pseudomonasarten wie *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas pyocyanea* (*Pseudomonas aeruginosa*). Schon 1887 berichtet Garré<sup>179)</sup>, daß *Pseudomonas putida* das Wachstum von *Staph. aureus*, *B. typhosum* und *B. anthracis* hemmt, *Vibrio Finkler* und *Prior* werden nicht beeinflusst. T. Lewé<sup>180)</sup> ließ auf Agarplatten *Ps. putida* oder *Ps. fluorescens* wachsen. Auf dem gleichen Agar kultivierte er anschließend die Testorganismen. Er erhielt folgendes Bild (Tab. 9), das mit dem Ergebnis anderer Autoren teilweise in Widerspruch steht.

Anfangskultur mit	anschließend		
	gewachsen	schwach gewachsen	nicht gewachsen
<i>Ps. putida</i>	<i>B. typhosum</i> <i>B. coli</i>	<i>Staph. albus</i> <i>Vibrio cholerae</i>	<i>B. anthracis</i> <i>Staph. aureus</i> <i>B. anthracis</i>
<i>Ps. fluorescens</i>	<i>B. typhosum</i> <i>Vibrio cholerae</i>		

Tabelle 9.

W. D. Frost<sup>181)</sup> tauchte einen Collodiumbeutel mit einer Kultur von *B. typhosum* in die Kultur von *Ps. putida* und *Ps. fluorescens*. Die Typhusbacillen wurden getötet.

Die Testmethodik von J. M. Lewis<sup>182)</sup> wurde bereits geschildert (s. S. 167). *Ps. fluorescens* unterdrückte das Wachstum von *B. mycoides*, *B. subtilis*, *B. vulgatus*, *B. cereus*. Daneben wurden noch zahlreiche andere Arten untersucht. Die empfindlichsten Bakterien wurden durch Zusatz von sterilem gebrauchten Kulturmedium noch in einer Verdünnung

von 1 : 100 vollkommen gehemmt. Schimmelpilze waren unempfindlich, während Hefe in 20—50% gebrauchtem Kulturmedium nicht mehr wuchs. Bei gleichzeitiger Impfung von *B. cereus* und *B. fluorescens* entwickelte sich der erste nicht, während der letztere kräftig wuchs<sup>183)</sup>. Über einen Selbsthemmungseffekt bei *Ps. fluorescens* berichtet O. Rahn<sup>184)</sup>. Dieser Stoff ist thermolabil im Gegensatz zu dem heteroantagonistischen Stoff des Nährmediums, welcher thermoresistent ist.

Auf die hygienische Bedeutung des *B. fluorescens liquefaciens* bei der Reinigung des Wassers wies zuerst L. Olitsky<sup>185)</sup> hin. Er zeigte, daß *B. typhosum*, *B. anthracis*, *V. cholerae*, *B. prodigiosum* und *Staph. aureus* durch *Fluorescens* gehemmt werden.

Den Antagonismus von *Fluorescens* gegen andere Bodenorganismen wie Actinomyceten zeigte in neuerer Zeit S. A. Waksman<sup>186)</sup>.

Trotz der großen Zahl von Angaben über *Fluorescens*-Antagonismen ist doch niemals über eine Reinigung des antagonistischen Princips berichtet worden. Vielleicht läßt sich ein Teil der Beobachtungen auch dadurch erklären, daß die *Fluorescens*bakterien einen für den anderen Organismus lebenswichtigen Faktor verbrauchen oder unwirksam machen, der dann durch Diffusion in ihrer Umgebung verschwindet und so dem Konkurrenten die Lebensmöglichkeiten nimmt. Kluyver, T. Hof u. H. G. J. Boezaard<sup>147)</sup> berichten, daß Inosit durch *Ps. fluorescens* sehr leicht angegriffen und in kurzer Zeit zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O verbrannt wird. Man kann sich vorstellen, daß Organismen, für die Inosit ein Wachstoffsstoff ist, dann nur schlecht in Gegenwart von *Ps. fluorescens* wachsen können.

**Pyocyanase.** Im Jahre 1889 berichtete E. Freudenreich<sup>187)</sup>, daß *Ps. pyocyanea* das Wachstum von Typhus- und Cholera-bacillen ungünstig beeinflusst. 10 Jahre später untersuchten R. Emmerich u. O. Löw<sup>188)</sup> diese Erscheinung. Sie vermuteten in der antagonistischen Substanz ein bakteriolytisches Enzym, welches fremdartige Bakterien zur Auflösung bringt. Das Enzym aus *Ps. pyocyanea* nannten sie daher **Pyocyanase**. Sie schlugen die therapeutische Verwendung der filtrierten und dialysierten Kulturlösung vor. Etwas später wurden genaue Angaben über die Bakteriolyse von *B. anthracis* durch *Pyocyanase* gemacht und über die morphologischen Veränderungen berichtet, die der Organismus bei kleineren Konzentrationen des Bakteriolytikums erleidet<sup>189)</sup>. L. Tavernari<sup>190)</sup> wendete mit Erfolg die *Pyocyanase* von Emmerich u. Löw bei experimentellem Milzbrand an. K. Vaerst<sup>191)</sup> erreichte eine Immunisierung gegen Milzbrand bei vorheriger Behandlung mit *Pyocyanase*.

1902 berichteten R. Emmerich, O. Löw u. A. Korschun<sup>192)</sup> über die Auflösung von Cholera-vibrionen mit *Pyocyanase*. Eine trübe Suspension wurde in wenigen Minuten vollkommen klar.

H. Raubitschek u. V. K. Russ<sup>193)</sup> zeigten später, daß *Pyocyanase* viele Eigenschaften habe, die ihre Fermentnatur sehr zweifelhaft erscheinen ließen. Die bakteriolytische Substanz ist thermostabil, wird weder durch Ammonsulfat noch durch Alkohol gefällt und ist löslich in Alkohol, Äther, Benzol, Aceton und Chloroform.

Sonnenberger<sup>194)</sup> berichtete, daß *Pyocyanase* Pneumococci in 3, Gonococci und Cholera-vibrionen in 5, Diphtherie-bacillen und Streptococci in 10 min, Typhus- und Dysenterie-bacillen in 2—3 h vernichtet, auch wenn die Aussaat viele Millionen Bakterien betrug.

Besonders günstig wurde der Prozeß bei Abszessen, Phlegmonen, Ulcus cruris gestaltet. Für die Gewebe ist das Präparat unschädlich. G. Favreul u. L. Fortineau berichten, daß sie von 69 Anthrax-Fällen 68 mit *Pyocyanase*-Behandlung heilen konnten<sup>195)</sup>. A. Lode bemerkt im Handbuch der pathogenen Mikroorganismen<sup>196)</sup>: „Trotz dieser Empfehlungen ist die *Pyocyanase*-Therapie aus der neuesten Literatur nahezu vollständig verschwunden. Wie erfahrene Kliniker uns mitteilen, nicht mit Recht, da bei manchen Prozessen putriden Natur

<sup>177)</sup> H. J. Conn u. J. W. Wight, J. agric. Res. 16, 313 [1919].

<sup>178)</sup> Zbl. Bakteriell., Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. II 16, 417 [1906].

<sup>179)</sup> Inaug. Diss. Bern 1891.

<sup>180)</sup> S. A. Waksman u. J. W. Foster, Soil Sci. 43, 69 [1937].

<sup>181)</sup> Jber. Path. Mikroorg. 5, 530 [1889].

<sup>182)</sup> Z. Hyg. Infekt.-Krankh. 31, 1 [1899].

<sup>183)</sup> R. Emmerich u. Saida, Zbl. Bakteriell., Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. I 27, 776 [1900].

<sup>184)</sup> Ebenda 31, 786 [1902].

<sup>185)</sup> Ebenda 31, 293 [1902].

<sup>186)</sup> Ebenda 31, 1 [1902].

<sup>187)</sup> Ebenda 48, 114 [1908].

<sup>188)</sup> Abhdl. Würzburg 13, 251 [1913].

<sup>189)</sup> C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées 86, 774 [1922].

<sup>190)</sup> Handb. d. pathog. Mikroorg. von Kraus, Kolle u. Uhlenhuth, Jena, Berlin, Wien 1929.

<sup>177)</sup> W. K. Anslow, H. Raistrick u. G. Smith, J. Soc. chem. Ind. 62, 236 [1943].

<sup>178)</sup> Unveröffentlicht.

<sup>179)</sup> Zbl. Bakteriell., Parasitenkunde Infektionskrankh. 2, 312 [1887].

<sup>180)</sup> Beitr. pathol. Anatom. allg. Pathol. 6, 277 [1889].

<sup>181)</sup> J. infect. Diseases 1, 599 [1904].

<sup>182)</sup> J. Bakteriell. 17, 89 [1929].

oder bei stark verunreinigten Wunden die Reinigung des Wundgrundes rasch und ohne jede Schädigung des Gewebes einzutreten pflegt."

Über die chemische Natur der Pyocyanase ist in dem letzten Jahrzehnt einige Aufklärung geschaffen worden. Chatton<sup>197)</sup> hielt sie für ein Fettsäureglucosid oder ein „glycoside véhiculé par un lipide“. Gundel u. Wagner<sup>198)</sup> machten durch histologischen Nachweis nach Römighaus wahrscheinlich, daß die Wirkung des lipoidlöslichen Extraktes aus *Ps. pyocyanea* durch Fettsäuren bedingt ist. H. O. Hettche<sup>199)</sup> zeigte dann, daß die baktericide Substanz tatsächlich im sauren Anteil des Petrolätherextraktes der Bakterien enthalten ist. 5–10% des Lipoids der Bakterien stellt die „Pyocyaneussäure“ dar. Aus *B. fluorescens* ließ sich auf entsprechende Weise keine aktive Substanz gewinnen. Die Pyocyaneussäure ist flüssig, von intensiv ranzigem Geruch, das Molekulargewicht etwa 370. Die Säure zeigte noch mit 1 : 25 000 starke Entwicklungshemmung der einzelnen Kolonien und Lyse von Staphylococcen.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam L. Birch-Hirschfeldt<sup>200)</sup>. Pyocyanase in nativem Zustand zeigte mit 1 : 27 000 starke baktericide Wirkung. Die Wirksamkeit war eine Funktion der Oberflächenaktivität der einzelnen Fraktionen. Auch gegen Protozoen zeigte das Präparat große Wirksamkeit. Über toxisch abschwächende Eigenschaften der Pyocyanase berichteten Okhubo<sup>201)</sup> u. E. Neter<sup>202)</sup>.

Einen dem *B. pyocyaneus* sehr ähnlichen Bacillus isolierten S. A. Waksman u. H. B. Woodruff<sup>203)</sup> aus dem Boden. Er gehört zur *Ps. aeruginosa*-Gruppe und hindert das Wachstum von mehreren grampositiven und -negativen Bakterien. Die antagonistische Substanz ging durch ein Seitz-Filter, wurde an Kohle adsorbiert, war äther-löslich und hitzestabil. Es wurden hochaktive Präparate erhalten, die das Wachstum von *Escherichia coli*, *Brucella abortus* und anderen Bakterien hemmten. Pilze wurden nicht im Wachstum beeinflusst. Es ist nicht angegeben, ob es sich hier um eine der Pyocyanase ähnliche Substanz handelt.

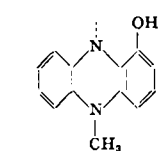
Auch den Farbstoffen der Chromobakterien werden antibakterielle Eigenschaften zugeschrieben. Nach H. O. Hettche<sup>204)</sup> tötet Pyocyanin (XII) Diphtheriebacillen mit 1 : 4000 bis 1 : 8000, sporenfreie Milzbrandbacillen mit 1 : 400. Über die bakteriostatische Wirkungsstärke findet sich keine Angabe. O. Chrisman<sup>205)</sup> beobachtete ebenfalls die baktericide Wirkung von Pyocyanin, fand sie aber viel geringer als Hettche. *Micrococcus pyogenes aureus* wurde erst mit 1 : 250 bis 500 getötet. Auf Staphylococcen hatte der Farbstoff mit 1 : 1000 keinen Einfluß. In geringerer Konzentration (bis 1 : 10 000) förderte er die Atmung der Staphylococcen. Einen antibakteriellen Einfluß von Pyocyanin auf Wachstum und Stoffwechsel beschreibt R. Schoental<sup>206)</sup>.

Die großen Unterschiede in der Wirksamkeit der Phenazinpigmente bei verschiedenen Testorganismen zeigten sich auch bei dem Pigment von *Chromobacterium iodinum* und dem des *B. chlororaphis*<sup>207)</sup>. Das erste ist das N,N-Dioxyd von Dioxyphenazin<sup>208)</sup> (XIII). Die Verbindung zeigt sich auswählend hemmend gegenüber bestimmten Stämmen von *Streptococcus hämolyticus*. Mit 1,7  $\gamma$ /cm<sup>3</sup> verminderte es in Bouillon und synthetischem Medium das Wachstum vollständig für mehr als 6 Tage. Gegenüber Staphylococcen, Typhusbacillen, *Proteus vulgaris* und *B. coli* war aber die Wirksamkeit unerheblich. 2  $\gamma$  des Pigmentes verminderten das Wachstum von *Streptococcus hämolyticus* innerhalb eines Kreises von 1 cm Radius. Kultiviert man *Chromobacterium iodinum* auf Agar, so produziert es 100  $\gamma$ /cm<sup>2</sup>.

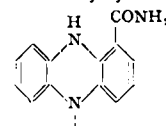
Chlororaphin<sup>209)</sup> (XIV), das Pigment von *B. chlororaphis*, ist ebenfalls antibakteriell wirksam, jedoch in geringerem Maß.

Nach H. O. Hettche<sup>210)</sup> kommt auch dem Prodigiosin (XV) dem roten Pigment des *B. prodigiosus*<sup>211)</sup>, erhebliche baktericide Wirkung zu. *B. anthracis* wird von der Konzentration 1 : 50 000, Staphylococcen werden von 1 : 25 000 getötet. Auf gram-negative Coli- und Paratyphusbacillen hat Prodigiosin keinen Einfluß.

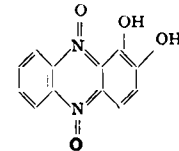
Auch sterile Bouillonextrakte von *B. prodigiosus* sollen antagonistische Wirkung gegenüber Diphtheriebacillen und Gonococcen besitzen<sup>212)</sup>. Eine mit Diphtheriebouillon bespatelte Agarplatte wurde mit 1 Öse *Prodigiosus* geimpft. Es bildete sich ein bakterienfreier Hof um die Prodigiosuskolonie. Die Kulturflüssigkeit war bei einer 14-Tagekultur nach der Entfernung der Bakterien und Verdünnung 1 : 4 noch deutlich hemmend. Die Substanz ist kein Lipoid und nicht hämolytisch wie Pyocyanase. Sie wird auch von bei 37° gezüchteten, farbstofffreien Kulturen gebildet.



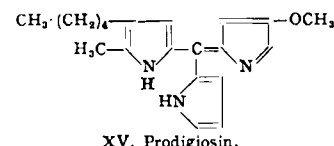
XII. Pyocyanin.



XIV. Chlororaphin.



XIII. Iodin.



XV. Prodigiosin.

Pigmente der Chromobakterien.

Über das ein rotes Pigment bildende *B. Kieli* wird berichtet<sup>213)</sup>, daß es den Pilz *Dictostelium mucoroides* vernichtet, wobei es zu intensiver Pigmentbildung kommt. Das blaue Pigment von *B. violaceus* setzt nur das Wachstum herab, während *B. fluorescens liquefaciens* umgekehrt dem Pilz als Nahrung dient.

### Aerobe Sporenbildner.

Aus der Klasse der aeroben sporenbildenden Bacillen, wie sie normalerweise im Darm des Säugetieres und im Boden vorkommen, werden mehrere Arten beschrieben, die charakteristische antagonistische Eigenschaften besitzen. 1920 sah E. G. Pringsheim<sup>214)</sup> auf Agarplatten eine Hemmung von Diphtheriebacillen durch *B. mesentericus vulgaris*. Es entstand ein bakterienfreier Hof. Er konnte aber keine antidiphtheriewirksamen Filtrate erhalten. J. Zukermann u. J. Minkewitsch<sup>215)</sup>, die ebenfalls den Diphtherieantagonismus von Mesentericusbacillen beobachteten, berichten dagegen, daß ihre Kulturfiltrate sehr wirksam gegen Bacillen in vitro waren. Sie töteten die Diphtheriebacillen in 40 min. Die Wirksamkeit war wenig hitzeresistent. Auch in neuerer Zeit wurde diese mehrmals bestätigt<sup>216)</sup>. Nach Nicolle<sup>217)</sup> lösen die Filtrate von Subtilskulturen Pneumococcen, Typhus, Colonbacillen und Choleravibrionen. Die Inoculation von *B. subtilis* in Kulturen dieser Organismen bewirkt die Klärung des Mediums. Auch H. Auerswald berichtet<sup>218)</sup>, daß beim Auftropfen von *B. subtilis* auf eine gleichmäßig mit Diphtheriebacillen bewachsene Agarplatte eine etwa 3–5 mm breite Hemmungszone rings um die Auftropfstelle entsteht.

Eine dem *B. subtilis* nahestehende Gruppe sind die *Tyrophthrix*-Bakterien. Sie wurden 1887 von G. Duclaux<sup>219)</sup> aus Käse isoliert und durch viele Jahre für die eigentlichen Käseerfäulnisbakterien gehalten (Käsefäden). Nach L. Rosenthal<sup>220)</sup> sind verschiedene dieser Tyrophthrixarten imstande, in vitro andere Bakterien aufzulösen. Am wirksamsten war *Tyrophthrix scaber*. Die Wirksamkeit tritt in den Kulturen zwischen dem 4. und 5. Tag auf, erreicht ihr Maximum am Ende der 2. oder 3. Woche, bleibt dann etwa 1 Monat konstant und nimmt dann wieder ab. Um aktive Lösungen zu bekommen, muß eine intakte Haut von *T. scaber* auf dem Nährmedium gebildet werden. Die immensen Kulturen sind unwirksam. Die lytische Aktivität wird durch Erhitzen auf 70° zerstört.

Staphylococcen, *B. Eberth*, *B. paratyphosus*, *P. vulgaris* waren gegenüber den filtrierten und verdünnten Kulturlösungen verhältnismäßig resistent (1 : 4 noch wirksam), während *B. anthracis*, *V. cholerae* und *B. dysenteriae* sehr leicht angegriffen wurden. B. diphtheriae und Gonococcen stehen zwischen den beiden Gruppen<sup>221)</sup>. Bei intravenöser, intraperitonealer oder subcutaner Injektion lebender Kulturen von *T. scaber* verhält

<sup>197)</sup> C. R. soc. chim. biol. 79, 63 [1930].

<sup>198)</sup> Z. Immunitätsforsch. exp. Therap. 69, 63 [1930].

<sup>199)</sup> Klin. Wschr. 12, 1804 [1933]. <sup>200)</sup> Z. Hyg. Infekt.-Krankh. 116, 304 [1935].

<sup>201)</sup> Z. Immunitätsforsch. exp. Therap. 5, 428 [1910]. <sup>202)</sup> Science 96, 210 [1942].

<sup>203)</sup> J. Bacteriol. 40, 581 [1940]. <sup>204)</sup> Arch. Hyg. Bakteriell. 107, 337 [1932].

<sup>205)</sup> Z. Hyg. Infekt.-Krankh. 116, 209 [1935].

<sup>206)</sup> Brit. J. exp. Pathol. 22, 137 [1941].

<sup>207)</sup> H. McIlwain, Nature [London] 148, 628 [1941].

<sup>208)</sup> G. R. Clemo u. H. McIlwain, J. chem. Soc. [London] 1938, 479.

<sup>209)</sup> F. Kögl u. J. J. Postovsky, Liebigs Ann. Chem. 480, 280 [1930].

<sup>210)</sup> Arch. Hyg. Bakteriell. 107, 337 [1932].

<sup>211)</sup> F. Wrede u. A. Rothaus, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 226, 95 [1934].

<sup>212)</sup> M. Eisler u. J. Jacobsohn, Z. Hyg. Infekt.-Krankh. 117, 76 [1936].

<sup>213)</sup> E. Pinoy, Ann. Inst. Pasteur 21, 622, 686 [1907].

<sup>214)</sup> Zbl. Bakteriell., Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. II 51, 72 [1920].

<sup>215)</sup> Ebenda, Abt. I 80, 483 [1925–26]. <sup>216)</sup> H. Auerswald, Diss. Freiburg [1938].

<sup>217)</sup> Ann. Inst. Pasteur 21, 613 [1907]. <sup>218)</sup> I. c. Fußnote 175.

<sup>219)</sup> Le lait, Paris 1887, S. 213.

<sup>220)</sup> C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées 92, 78 [1925]; 93, 77 [1925].

<sup>221)</sup> Rosenthal, ebenda 95, 10 [1926].



er sich ausgesprochen enterotrop, d. h. nach kurzer Zeit siedelt er sich im Darm an, während er aus dem Blut und den inneren Organen sehr schnell verschwindet <sup>222</sup>). Da wie *Rosenthal* angibt, die Auflösung der angegriffenen Bakterien meist mehrere Tage dauert, wird sich der Effekt auch durch Autolyse erklären lassen, wenn man annimmt, daß das Filtrat die Bakterien tötet.

Ähnliche Wirkungen wie Tyrothrix zeigte ein Stamm von *B. mycoides* <sup>223</sup>). Kultur und Filtrate lösten eine große Zahl anderer Bakterienarten auf. Dabei verloren die gelösten Bakterien aber nicht ihre antigenen Eigenschaften. Auch *H. Franke* u. *H. Ismet* <sup>224</sup>) isolierten einige Stämme von *B. mycoides* mit starker cytolytischer Aktivität. Gelöst wurden 4-Tagekulturen von lebenden Typhusbacillen, Paratyphus A und B, Shiga, Dysenterie, Colon, Diphtherie, *Ps. pyocyanea*, 3 Arten Staphylococci, 3 Streptococci, *Proteus vulgaris*, Pneumococci und 15 Stämme von Bakterien, die aus der Luft isoliert wurden.

**Gramicidin und Tyrocidin:** Am besten erforscht aus dieser Gruppe von Bakterien ist ein Stamm von *Bacillus brevis*, der von *R. J. Dubos* <sup>225</sup>) aus Moorboden isoliert worden ist. *Dubos* ging von dem Gedanken aus, daß jede organische Substanz, die dem Boden zugesetzt wird, dem Abbau durch Mikroorganismen anheim fällt. Dieser Gedanke hatte sich schon bei der Isolierung und Adaptierung eines Bakteriums bewährt, welches ein Polysaccharid aus den Kapseln von Pneumococci fermentativ abbaut <sup>226</sup>), das allen anderen tierischen und pflanzlichen Fermenten gegenüber völlig resistent ist. Es schien möglich, daß nicht nur isolierte lösliche Verbindungen anderer Mikroorganismen angegriffen würden, sondern auch die intakten lebenden Zellen selbst. Durch ständig wiederholtes Zufügen lebender grampositiver Cocci zu Bodenproben und anschließendes Bebrüten, ein Vorgang, der 2 Jahre lang fortgesetzt wurde, gelang es *Dubos* schließlich, einen Stamm zu isolieren, der lebende Zellen der zugefügten Spezies sehr schnell angriff und auflöste. Dieser Stamm wurde als *Bacillus brevis* identifiziert und als aerobes sporenbildendes Stäbchen beschrieben. Aus den Kulturen dieses *Bacillus* stellten *R. J. Dubos* u. *C. J. Cattaneo* <sup>227</sup>) eine zwar noch nicht reine aber hoch bactericide Substanz her, welche kein Protein war. Die Substanz wurde Tyrothricin genannt. Aus ihr wurden später zwei kristallisierte Stoffe Gramicidin und Tyrocidin-Chlorhydrat gewonnen <sup>228, 229</sup>). Außer diesem ersten wirksam befundenen Stamm konnten später noch weitere isoliert werden, die ebenfalls sehr aktiv waren und die kristallisierten bactericiden Stoffe lieferten. Weiters hat *J. C. Hoogerheide* <sup>230</sup>) bactericide Substanzen mit ähnlichen Eigenschaften aus verschiedenen aeroben sporenbildenden Organismen beschrieben. Aus einem dieser Stämme hat er ebenfalls kristallisiertes Gramicidin erhalten.

Zur Gewinnung <sup>231</sup>) der antibakteriellen Stoffe ließ man die Kulturen autolysieren. Beim Ansäuern fiel die aktive Substanz aus. Aus ihr erhielt man einerseits durch Extraktion mit neutralem Puffer einen wasserlöslichen bactericiden Stoff, andererseits durch Alkohol-Extraktion bei saurer Reaktion einen wasserunlöslichen. Dieser wurde Tyrothricin genannt. Die wasserlösliche Fraktion hatte Protein-Natur und zerfiel bei Behandlung mit saurem Alkohol in eine unlösliche Fällung und einen alkohol-löslichen Anteil, welcher identisch mit Tyrothricin war. Dieses scheint ein Abbauprodukt der vorher wasserlöslichen Protein-Fraktion zu sein. Die gleiche wasserunlösliche wirksame Substanz erhielt man aus der wasserlöslichen Protein-Fraktion durch enzymatischen Abbau mit proteolytischen Fermenten. Es wird daher angenommen, daß Gramicidin und Tyrocidin im Kulturautolysat in Bindung an Eiweiß vorliegen, dessen bactericide Wirkung wenigstens z. T. auf den Gehalt an diesen beiden Stoffen zurückzuführen ist. Im Tyrothricin sind etwa 10—20% Gramicidin und 40—60% Tyrocidinchlorhydrat enthalten.

**Konstitution** <sup>232</sup>): Gramicidin kristallisiert in farblosen dünnen Plättchen vom F. 230—231°. Die optische

Drehung beträgt  $[\alpha]_D^{25} = +5^\circ$  ( $c = 0,4\%$  in 95% Alkohol). Bei der Analyse erhält man 62,7% C, 7,59% H, 14,8% N. Nach der Extraktion von Gramicidin aus dem Tyrothricin mit Aceton-Äther wird der Rückstand mit Alkohol ausgekocht und aus der Lösung Tyrocidin als Chlorhydrat durch Zufügen von alkoholischer Salzsäure erhalten. Es kristallisiert aus Methanol in feinen farblosen Nadeln. Es schmilzt unscharf bei etwa 240° unter Zersetzung. Die optische Drehung ist  $[\alpha]_D^{25} = -101^\circ$  ( $c = 1\%$ , 95% Alkohol). Die Analyse ergibt 59,6% C, 6,66% H, 14,3% N, und 2,7% Cl. Es wird angegeben, daß eine Lösung von 1 mg Tyrocidin in 100 cm<sup>3</sup> Wasser stark schäumt und ähnlich wie die Invertseifen <sup>233</sup>) eine Anzahl löslicher Proteine fällt. Die beiden kristallisierten Verbindungen sind Polypeptide mit dem ungefähren Molekulargewicht 3000. Die Aminosäuren von Gramicidin <sup>234</sup>) liegen sehr wahrscheinlich in folgender Zusammensetzung vor (Tab. 10):

Leucin .....	6
Tryptophan .....	12
Valin .....	5
Alanin .....	3
Glykokoll .....	2
Oxy-amino-säure (iso-Serin?) ...	2
Summe	30

Tabelle 10.

Von Tyrocidin liegt keine entsprechende Analyse vor. Es wurden darin Tyrosin, Asparaginsäure und Tryptophan nachgewiesen.

Von besonderem Interesse ist der Befund, daß ein Teil der Aminosäuren die „unnatürliche“ d-Konfiguration besitzt <sup>235</sup>). Im Gramicidin liegen 45%, im Tyrocidin 20% der Aminosäuren als d-Form vor. Es wurden d-Leucin und d-Alanin isoliert. Neben der Kapselsubstanz von *B. anthracis* <sup>236</sup>) und den Mutterkornalkaloiden <sup>237</sup>) sind dies die einzigen bisher bekannten gesicherten Vorkommen von d-Aminosäuren in der Natur. Der Gehalt an unnatürlichen Formen der Aminosäuren ist, wie man annehmen kann, der Grund für die Unangreifbarkeit für proteolytische Fermente.

**Biologische Wirkung:** Die Austestung an Bakterien ergab, daß 1  $\gamma$  Gramicidin 1 Milliarde grampositive Bakterien tötet, während Tyrocidin je nach dem geprüften Organismus bis 50mal weniger wirksam war. Der Tod der Zellen ist von einer Lyse begleitet, die im Verlauf einiger Stunden erfolgt, aber auf autolytische Vorgänge zurückzuführen ist. Beide Substanzen greifen in den Stoffwechsel der Bakterien ein. Tyrocidin blockiert alle oxydativen Prozesse, die geprüft wurden, Gramicidin scheint nur in gewisse besondere Reaktionen einzugreifen. Die pharmakologische und toxiologische Prüfung von Gramicidin, Tyrocidin und Tyrothricin <sup>238</sup>) hat gezeigt, daß die drei Stoffe bei peroraler Gabe noch mit 1 g/kg von Mäusen und Ratten vertragen werden. Intravenös sind 3 mg/kg tödlich, während bei Tyrocidin die tödliche Dosis 15 mg/kg beträgt. Bei intraperitonealer Applizierung liegen die Mengen höher. Der Tod erfolgt nach anfänglicher Unruhe und Absinken der Körpertemperatur durch Atemlähmung.

Hunde wurden von täglich 2 mg innerhalb von 2—8 Tagen getötet. Die anatomische Untersuchung zeigte Degeneration der meisten Organe: Milzvergrößerung, Fettleber und häufig Ascites.

Es wurden auch Versuche zur therapeutischen Anwendung von Gramicidin und Tyrocidin gemacht. Die beiden Stoffe bewährten sich bei der lokalen Behandlung von Wundinfektionen, wobei mit Spülungen durch sehr verdünnte Lösungen schon schnelle Beseitigung der Infekte erzielt wurde. In der Veterinärmedizin fanden die Substanzen Anwendung bei Mastitiden. Bei Infektion mit *Streptococcus agalactiae* erreichten *R. B. Little*, *R. J. Dubos* u. *R. D. Hotchkiss* <sup>239</sup>) durch Injektion von Gramicidin ins Euter eine rasche Heilung in 26 von 31 untersuchten Fällen. *Streptococcus uberis*-Infektionen sprachen jedoch wesentlich schlechter an. Durch die große Giftigkeit und die hämolytische Wirkung wird Gramicidin nur beschränkte therapeutische Anwendung finden können.

<sup>222</sup>) *Rosenthal*, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées 94, 309, 1059 [1926].

<sup>223</sup>) *H. Much* u. *F. Sartorius*, Med. Klin. 20, 347 [1924].

<sup>224</sup>) Zbl. Bakteriologie, Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. I 99, 370 [1926].

<sup>225</sup>) J. exp. Med. 70, 1 [1939].

<sup>226</sup>) *R. J. Dubos* u. *O. T. Avery*, Science 72, 151 [1930]; 55, 377 [1933]; 62, 259 [1935].

<sup>227</sup>) J. exp. Med. 70, 249 [1939].

<sup>228</sup>) *R. O. Hotchkiss* u. *R. J. Dubos*, J. biol. Chemistry 138, 803 [1940].

<sup>229</sup>) Dieselben, ebenda 132, 791 [1940].

<sup>230</sup>) J. Bacteriol. 40, 415 [1940]; J. Franklin Inst. 229, 805 [1940].

<sup>231</sup>) *R. D. Hotchkiss* u. *R. J. Dubos*, J. biol. Chemistry 141, 155 [1941].

<sup>232</sup>) *R. D. Hotchkiss*, J. biol. Chemistry 141, 171 [1941]; *H. N. Christensen*, *R. R. Edwards* u. *H. D. Piersma*, ebenda 141, 187 [1941].

<sup>233</sup>) *R. Kuhn* u. *H. J. Biebig*, Ber. dtsch. chem. Ges. 73, 1080 [1940].

<sup>234</sup>) *A. H. Gordon*, *A. J. P. Martin* u. *R. L. M. Syngé*, Biochem. J. 37, 86 [1943].

<sup>235</sup>) *F. Lipmann*, *R. D. Hotchkiss* u. *R. J. Dubos*, J. biol. Chemistry 141, 163 [1941].

<sup>236</sup>) *G. Ivanovics* u. *V. Bruckner*, Naturwiss. 25, 250 [1937]; Z. Immunitätsforsch. exp. Therap. 90, 304 [1937]; Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 247, 281 [1937].

<sup>237</sup>) *W. A. Jacobs* u. *L. C. Craig*, J. biol. Chemistry 110, 522 [1935].

<sup>238</sup>) *H. D. Robinson* u. *H. Molitor*, J. Pharmacol. exp. Therapeut. 74, 75 [1942].

<sup>239</sup>) Proc. Soc. exp. Biol. Med. 44, 444 [1940]; 45, 462 [1940].

### c) Die Bedeutung der Antibiose für das Leben der Pflanzen.

Die zuletzt geschilderten antibiotischen Bakterienarten wurden aus dem Boden gewonnen, ebenso, wie die verschiedenen antagonistischen Actinomyceten, Fluorescenzbakterien und diesen nahestehenden Pseudomonasarten, welche in den vorhergehenden Abschnitten behandelt wurden. Die Isolierung von Gramicidin, Tyrocidin und Actinomycin hat uns die Natur von chemischen Waffen gezeigt, mit denen die verschiedenen Partner der Symbiose unter den bodenbewohnenden Mikroorganismen zur Abwehr fremder Keime beitragen und wohl auch sich gegenseitig dezimieren. Auf diese Weise werden konstante, für einzelne Böden charakteristische Populationen aufrechterhalten, welche wiederum mit den in diesen wachsenden höheren Pflanzen in symbiontischen Beziehungen stehen. Für das Gedeihen oder Nichtgedeihen bestimmter Pflanzen auf bestimmten Böden ist die Mikroflora der Böden weitgehend verantwortlich. Für die absolute Zahl der bakteriellen Keime des Bodens sind vor allem gewisse Protozoen von Bedeutung, da die Bakterien den Protozoen als Nahrung dienen<sup>240</sup>). Umgekehrt setzen sich jedoch auch die Bakterien zur Wehr. Die den höheren Tieren so ungemein schädlichen Bakterientoxine dürften auch für manche Einzeller giftig sein. Oft handelt es sich aber wohl auch um spezifischere Stoffe. So berichtet Chatton<sup>241</sup>), daß sich die Anwesenheit von bestimmten Bakterien auf sexuelle Vorgänge bei dem Flagellaten *Glaucoma scintillans* auswirkt. Die Kopulation, d. h. Zygotenbildung, wird von manchen Bakterienarten gefördert, von anderen gehemmt. Die Bakterien werden daher in zygotene und azygotene eingeteilt. Als zygoten besonders wirksam wurde *B. prodigiosus* befunden, während *B. coli* stark azygoten war. Für Protozoen giftige Stoffe wurden außerdem aus den uns schon bekannten Chromobakterien gewonnen. *B. prodigiosus*, *B. violaceus*, *B. pyocyaneus* und ein anderes, rot gefärbtes Chromobakterium lieferten Extrakte, an denen Bodenamoeben sehr schnell zugrunde gingen<sup>242</sup>). Die Empfindlichkeit gewisser menschenpathogener Protozoen für Pyocyanase hat auch L. Birch-Hirschfeld<sup>243</sup>) berichtet. Dies sind wahrscheinlich biologisch sehr wichtige Wirkstoffe, da die gänzliche Vernichtung der Bodenbakterien durch die Protozoen zur Unfruchtbarkeit des Bodens führen würde. Für das Gleichgewicht zwischen Bakterien und Protozoen im Boden ist daneben natürlich auch die größere enzymatische Aktivität und Anpassungsfähigkeit der Bakterien an die Nahrungsstoffe maßgebend. Nach D. W. Cutler u. L. M. Crump<sup>244</sup>) werden die Bakterien des Bodens durch die Protozoen auf ein für den Pflanzenwuchs besonders günstiges Maß reduziert.

Auch für die Pflanzenhygiene sind die Mikroben des Bodens von großer Bedeutung. Eine große Zahl von Bodenorganismen, darunter Pilze, Actinomyceten, Bakterien und Protozoen üben antagonistische Wirkungen auf bestimmte Pflanzenschädlinge aus<sup>245</sup>). So berichten z. B. C. M. Haenseler u. M. C. Allen<sup>246</sup>), mit *Trichoderma* die schädlichen Pilze *Rhizoctonia* und *Pythium* im Wachstum unterdrückt zu haben. Diese verursachen das Austrocknen junger Gurkenkeimlinge. Auch der die Kartoffelkrätze verursachende *Actinomyces scabies* und der Erreger der Pockenkrankheit der Kartoffel *Rhizoctonia solani* lassen sich mit *Trichoderma* bekämpfen<sup>247</sup>). R. H. Bamberg hat entdeckt, daß gewisse Bakterien die Entwicklung des Branderreger *Ustilago zaeae* innerhalb der Maispflanze verhindern<sup>248</sup>), und S. M. Baker fand, daß die Injektion von *Coprinus*-Extrakten die Silberblattkrankheit von Obstbäumen verhütet<sup>249</sup>). Nach einer Reihe von Arbeiten über den Antagonismus einiger Pilze gegen pflanzenschädigende Mikroorganismen<sup>250</sup>) berichtet R. Weindling über die Gewinnung der toxischen Substanz aus *Trichoderma*<sup>251</sup>) und später derjenigen aus *Gliocladium fimbriatum*<sup>252</sup>), welche als mit Chloroform extrahierbar und weniger empfindlich als die erste beschrieben und Gliotoxin genannt wird. Die Reindarstellung und Kristallisation dieses Stoffes ist jedoch erst vor Kurzem gelungen.

Für Gliotoxin wurde zunächst von Dutcher<sup>253</sup>) die Bruttoformel  $C_{14}H_{16}N_2S_2O_4$  aufgestellt, später aber von Johnson,

Bruce u. Dutcher<sup>254</sup>) mit  $C_{13}H_{14}N_2S_2O_4$  angegeben. Gliotoxin ist toxisch für Tiere. Da es sowohl gegenüber Pilzen wie auch Bakterien antibiotisch wirksam ist, ähnelt es in seiner biologischen Aktivität dem Actinomycin. Gliotoxin wurde auch in der Nährlösung von *Aspergillus fumigatus* aufgefunden (s. unter IIIa).

### d) Die Bedeutung der Antibiose für das Leben von Tieren und Menschen.

Ebensowenig wie die Pflanzen ohne die Mikroflora des Bodens leben könnten, wäre es den Tieren und den Menschen möglich, ohne die symbiontischen Mikroorganismen ihrer inneren Organe zu existieren. Auf die speziellen Leistungen der Symbionten im Pansen der Wiederkäuer, in den Mycetomen der Insekten und im Darm der Säugetiere wurde im Abschnitt Symbiose hingewiesen. In allen diesen Fällen aber ist die symbiontische Mikroflora kein wahloses Gemisch verschiedenartiger Organismen, sondern stellt eine konstante charakteristische Population dar, deren Veränderung zum teilweisen oder ganzen Verlust der Funktion des symbiontenträgenden Organs führt. Es besteht eine weitgehende Anpassung des Wirtsorganismus an die Symbionten und umgekehrt<sup>255</sup>), was schon aus den in vielen Fällen sehr komplizierten Übertragungsmechanismen der symbiontischen Mikroflora auf die Nachkommenschaft hervorgeht. Für die „Erhaltung der Art“ dieser Population ist ebenso wie im Falle der Bodenflora die antibiotische Wirksamkeit dieser Organismen von großer Bedeutung. Die „Dysbakterie“, d. h. eine wesentliche Abweichung in Art und Umfang der Darmflora vom Normalzustand, wird von A. Nissle<sup>256</sup>) als Ursache verschiedenster Erkrankungen angesehen. Auf die Bedeutung der physiologisch-obligaten Darmflora unter besonderer Berücksichtigung der natürlichen Ernährungs- und Verdauungsvorgänge wies kürzlich T. Baumgärtel<sup>257</sup>) hin. Durch Zufuhr von Colistämmen mit besonders hoher antagonistischer Wirksamkeit („Mutaflor“ von Nissle) gelingt es in vielen Fällen, gute Heilerfolge zu erzielen. Nach A. Nissle<sup>258</sup>) steht der antagonistische Index von *B. coli* gegen *B. typhosus* in Zusammenhang mit der Milchsäure-Produktion. Van der Reis<sup>259</sup>) zeigte die antagonistische Wirkung von *B. coli* gegen *B. diphtheriae* und siedelte *B. coli* durch Sprühen in den Mund dort an. In neun Fällen war es noch 54 Tage später dort anwesend. Durch diese Behandlung ließen sich akute Fälle schnell zur Heilung bringen, und Bacillenträger wurden schnell bacillenfrei.

M. Lisbonne u. L. Carrère<sup>260</sup>) entwickelten durch häufige Passagen den Antagonismus Coli gegen Shigabacillus und wiesen ein aktives lytisches Prinzip nach. Später zeigte sich, daß dieses nur gebildet wird, wenn außer *Coli* und *Shiga* noch andere Bakterien anwesend sind. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von P. Fabry gemacht<sup>261</sup>), während J. Bordet<sup>262</sup>) berichtet, daß bei 4 nicht lytischen Stämmen von *B. coli* lytische Eigenschaften spontan entstanden und durch Passagen verstärkt werden konnten.

Auch für einen anderen regulären Darmbewohner, den *B. acidophilus*, sind zahlreiche Antagonismen beschrieben. Die Anwendung von Reinkulturen dieses Organismus für therapeutische Zwecke wurde wiederholt vorgeschlagen<sup>263</sup>). Ein ähnlicher Milchsäure-Bildner, der *B. bulgaricus*, wurde zuerst von Melchnikoff<sup>264</sup>) zur antagonistischen Bekämpfung der Darmfäulnis angewendet<sup>265</sup>).

Aus dieser Gruppe von antagonistischen Mikroorganismen, wie sie den Darm des Säugetieres besiedeln, wurde noch in keinem Fall ein antibiotischer Wirkstoff in reiner Form dargestellt. Es ist aber zu erwarten, daß auch hier ähnliche Mittel angewandt werden, um die Infektion durch Fremdorganismen zu verhindern, wie bei der Mikroflora des Bodens, wo man schon in einigen Fällen die antibiotisch wirksamen Stoffe aus den Kulturen isolieren konnte.

Noch weniger weit ist man bei der Erforschung anderer symbiontischer Populationen gekommen. So ist z. B. nichts

<sup>240</sup>) E. J. Russel u. H. B. Hutchinson, J. agric. Sci. 3, 152 [1913].

<sup>241</sup>) C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées 93, 675 [1923].

<sup>242</sup>) B. N. Singh, Nature [London] 140, 168 [1942].

<sup>243</sup>) J. c. Fußnote 159. <sup>244</sup>) Problems in soil Microbiology, London 1935

<sup>245</sup>) J. Hino, Trans. Third. Int. Congr. Soil Sci. 1, 173 [1935].

<sup>246</sup>) Science 79, 6 [1934]. <sup>247</sup>) R. H. Daines, Amer. Potato J. 14, 85 [1937]

<sup>248</sup>) Phytopathology 21, 881 [1931]. <sup>249</sup>) Ann. Botany 27, 172 [1913].

<sup>250</sup>) Phytopathology 22, 837 [1932]; 24, 1110, 1141, 1153 [1934].

<sup>251</sup>) Ebenda 26, 1068 [1936]. <sup>252</sup>) Ebenda 27, 1175 [1937].

<sup>253</sup>) J. Bacteriol. 42, 815 [1941].

<sup>254</sup>) J. Amer. chem. Soc. 65, 2005 [1943].

<sup>255</sup>) P. Buchner, Symbiose und Anpassung. Nova acta Leopoldina N. F. 8, 237 [1940].

<sup>256</sup>) Verh. Ges. Verdgskrk. 1939, 362 u. frühere Arbeiten.

<sup>257</sup>) Klin. Wschr. 21, 265 [1942]. <sup>258</sup>) Dtsch. med. Wschr. 42, 1181 [1916].

<sup>259</sup>) Münchener med. Wschr. 68, 235 [1921]; Z. ges. exp. Med. 30, 1 [1922].

<sup>260</sup>) C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées 85, 569; 87, 1011 [1922]; 90, 265 [1924].

<sup>261</sup>) Ebenda 87, 369 [1922]; 90, 109 [1924]. <sup>262</sup>) Ebenda 90, 96 [1924].

<sup>263</sup>) L. F. Rettger u. H. A. Cheplin: The intestinal Flora with special reference to the implantation of „Bacillus acidophilus“, Yale University press 1921.

<sup>264</sup>) Zbl. Bacteriol., Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. II 20, 234 [1908].

<sup>265</sup>) Auf ähnliche Behandlungsmethoden mit lebender Hefe sei hier nur kurz hingewiesen. Schon die Mönche im Mittelalter verwendeten Hefe zur Behandlung von Pestkranken, und Hippokrates empfahl ihren Gebrauch bei Leukorrhoe (Fluor albus).

über Antibiose von Organismen der Pansenflora bekannt, obwohl die Erscheinung in diesem Falle sehr wahrscheinlich ist. Der Wiederkäuer nimmt ja mit der Nahrung eine große Zahl fremder Bakterien, Pilze und Hefen auf, gegenüber denen sich die normalen Pansenbewohner durchzusetzen haben. Die Pansenflora ist aber erst relativ wenig untersucht<sup>266)</sup>.

Die bei der Erforschung der Symbiose und Antibiose der Mikroorganismen gewonnenen Erkenntnisse werden vielleicht auch für die Wachstumsprobleme der vielzelligen höheren Pflanzen und Tiere von Bedeutung sein. Zwischen den einzelnen Arten von Einzellern, wie sie in der Natur zusammenleben, bestehen wahrscheinlich nicht sehr viel weniger enge stoffliche Beziehungen wie zwischen den einzelnen Zellenarten eines vielzelligen Organismus. Die symbiontischen Mikropopulationen in den Leuchtorganen gewisser Meerestiere, im Darm des Säugetieres, im Vormagen des Wiederkäuers, in den Knöllchen der Hülsenfrüchtler und in bestimmten Bodenarten sind ebenso wichtig für den Organismus des höheren Lebewesens, mit dem sie in Symbiose leben, wie die Zellen irgendeines seiner eigenen Organe. Wenn wir die Stoffe kennenlernen, mit deren Hilfe die Mikroorganismen die Populationen in einem Gleich-

gewicht erhalten dadurch, daß sie sich in ihrem Wachstum gegenseitig fördern bzw. hemmen, so können wir hoffen, daß wir vielleicht auch der Lösung des Problems der Formbildung beim Vielzeller etwas näherkommen werden, der Frage, warum sich das Wachstum hier in räumlich geordneten Verbänden vollzieht und stets nach einer gewissen Zeit zum Stillstand kommt.

Die Erforschung der Mittel, mit denen im Reiche der Mikroorganismen sich die einzelnen Arten im Kampf ums Dasein durchzusetzen suchen, läßt uns ein wichtiges Prinzip erkennen, durch welches das Leben auf der Erde erhalten wird. Wenn nämlich das Gleichgewicht der Lebewesen dauernd in irgendeiner Richtung verschoben würde, so daß eine Organismenart das Übergewicht über die anderen bekäme, so müßte sich die belebte Natur allmählich in eine Monokultur dieses Organismus verwandeln. Dies wäre aber gleichbedeutend mit dem Verschwinden des Lebens in unserem Sinne.

Daneben konnte gezeigt werden, daß manche Ergebnisse dieser Forschung auch im Sinne reiner Zweckmäßigkeit von Bedeutung bei der Behandlung von Infektionskrankheiten sind, da wir hier der Natur abgucken können, mit welchen Mitteln sie selbst Chemotherapie betreibt, wie sie erwünschte Lebewesen fördert und unerwünschte vernichtet. *Eingeg. 4. April 1944.* [A. 10.]

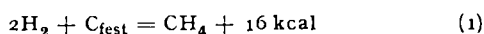
<sup>266)</sup> F. Baker, Nature [London] 149, 220, 582 [1942].

## Die Abtrennungsenergie einzelner Atome im Molekelverband am Beispiel des Methans<sup>1)</sup>

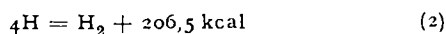
Von Dr. E. WICKE, Göttingen, Inst. f. physikal. Chemie

Das Methan darf wohl als die stabilste Molekel der organischen Chemie angesehen werden. Trotzdem ist es die einzige, bei der man bisher einigermaßen sichere und vollständige Aussagen über die Trennungsenergien der einzelnen Bindungen machen kann. Hierbei kommt uns zu Hilfe, daß die Bruchteile der Methan-Molekel, die Methyl- und Methylen-Radikale, in vielen reaktionskinetischen und photochemischen Prozessen als Zwischenprodukte auftreten und dort untersucht werden können. Insgesamt sind vier Dissoziationsstufen denkbar:  $\text{CH}_4 \rightarrow \text{CH}_3 + \text{H}$ ;  $\text{CH}_3 \rightarrow \text{CH}_2 + \text{H}$ ;  $\text{CH}_2 \rightarrow \text{CH} + \text{H}$  und  $\text{CH} \rightarrow \text{C} + \text{H}$ . Die freien Radikale werden natürlich andere Atomabstände und Valenzwinkel aufweisen als die Tetraedermolekel  $\text{CH}_4$ . Doch wollen wir hier von einer näheren Betrachtung der geometrischen Verhältnisse absehen und nur nach den Energie betragen fragen, die für die obigen vier Dissoziationen aufzuwenden sind. Dabei sollen sich die Ausgangs- und Endprodukte in ihren stabilen geometrischen Konfigurationen im idealen Gaszustand beim absoluten Nullpunkt befinden.

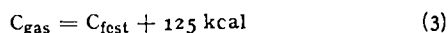
Zunächst berechnen wir den Durchschnittswert der vier Trennungsenergien, das ist ein Viertel des Energiebetrages, der nötig ist, um die vier H-Atome des Methans (bei 0° abs.) mit einem Schlage vom C-Atom zu trennen. Diese Energie bezeichnet man als atomare Bildungswärme  $D_0(\text{CH}_4)$  des Methans, da sie dieselbe Größe hat wie die Wärmetönung, die beim Zusammenbau des Methans aus den fünf Atomen frei wird. Wir gehen aus von der Bildungswärme des Methans aus den Elementen, die sich leicht aus der calorimetrisch ermittelten Verbrennungswärme berechnen und auf 0° abs. extrapolieren läßt:



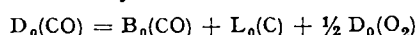
Die Dissoziation des Wasserstoffs in die Atome benötigt



ein Wert, der spektroskopisch mit großer Genauigkeit festgelegt wurde<sup>2)</sup>. Für die Verdampfung des Kohlenstoffs zu C-Atomen im Gaszustand sind erforderlich:



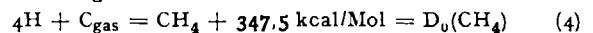
Dieser Wert wurde aus der spektroskopischen Dissoziationsenergie des Kohlenoxyds mittels der einfachen Beziehung



erhalten. Hierin bedeuten  $D_0(\text{CO}) = 210,8 \text{ kcal/Mol}$  und  $D_0(\text{O}_2) = 117,3 \text{ kcal/Mol}$  die Dissoziationsenergien des CO und  $\text{O}_2$ <sup>3)</sup>,  $B_0(\text{CO}) = 27,2 \text{ kcal/Mol}$  die Bildungswärme des CO aus den Elementen<sup>3)</sup>, alles bei 0° abs. Für  $L_0(\text{C})$ , die Sublimationswärme des Kohlenstoffs, ergibt sich hieraus 125 kcal/Mol, ein Wert, der mit einer Reihe experimenteller Untersuchungen

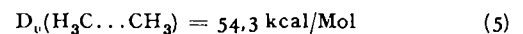
über die Sublimationsgeschwindigkeit und den Dampfdruck von Graphit übereinstimmt<sup>3)</sup>.

Durch Addition von Gl. (1) bis (3) erhalten wir für die atomare Bildungswärme des Methans:



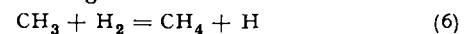
Als Durchschnittswert der vier Trennungsenergien des Methans ergibt sich somit als  $\frac{1}{4}$  dieses Wertes 87 kcal/Mol.

Die Einzelwerte der Trennungsenergien weichen von diesem Mittelwert erheblich ab. Dies wird sofort deutlich, wenn wir mit diesem Durchschnittswert z. B. an die Äthan-Molekel herangehen. Die atomare Bildungswärme des Äthans beträgt:  $D_0(\text{C}_2\text{H}_6) = 576,3 \text{ kcal/Mol}$ <sup>3)</sup>. Durch Abzug 6 durchschnittlicher C—H-Bindungen, d. h.  $6 \cdot 87 = 522 \text{ kcal/Mol}$ , bleibt für die Trennungsenergie der C—C-Bindung im Äthan ein Betrag von nur:



während alle Erfahrungen darauf hindeuten, daß diese Trennungsenergie erheblich höher, mindestens oberhalb 80 kcal/Mol liegen muß.

Um an die wirklichen Trennungsenergien heranzukommen, müssen wir uns mit den Bruchstücken der Methan-Molekel, insbes. mit dem Methyl- und Methylen-Radikal befassen. Calorimetrische Methoden versagen hier vollkommen, da an Radikalkonzentrationen bestenfalls 0,1 mm Hg und an Lebensdauern höchstens 0,1 s erreicht werden können. Daher sind die Radikale vorerst nur durch ihre Reaktionen zu erfassen. Hier liefert nun die Reaktionskinetik eine wertvolle Beziehung, eine Brücke zwischen den experimentell meßbaren Reaktionsgeschwindigkeiten und den energetischen Verhältnissen der Reaktionspartner. Diese Beziehung möge an der Reaktion klargemacht werden, die für die erste Dissoziationsstufe des Methans besonders wichtig ist:



Bei der Annäherung einer  $\text{H}_2$ -Molekel an ein  $\text{CH}_3$ -Radikal ist zunächst ein Abstoßungspotential zu überwinden, bis sich die beiden Partikeln soweit einander genähert haben, daß ein Umklappen der Elektronenbindungen möglich wird und  $\text{CH}_4$ -Molekel und H-Atom wieder auseinanderfliegen. In einem ebenen Diagramm läßt sich dieser Reaktionsverlauf grobschematisch nach Abb. 1 darstellen.

Hier bedeutet die Ordinate die potentielle Energie je zweier Partikeln, die Abscisse nach links den Abstand  $\text{CH}_3 \dots \text{H}_2$ , nach rechts den Abstand  $\text{CH}_4 \dots \text{H}$ . Der Koordinatenanfangspunkt ist in den Minimumabstand gelegt worden, bei dem die Reaktion, d. h. die Umorientierung der Valenzen, stattfindet. Der Umsatz Gl. (6) verläuft somit in Abb. 1 von links nach rechts. Den Abstand zwischen den Normalzuständen (links und rechts bei großen r-Werten) und der Höhe der Potential-

<sup>1)</sup> Lehrprobe, gehalten am 21. April d. J. im Institut für physikalische Chemie Göttingen.  
<sup>2)</sup> Aus G. Herzberg: Molekülspektren und Molekülstruktur, Bd. I, Steinkopff, Dresden [1939].

<sup>3)</sup> Vgl. „Trennungsenergien einzelner Bindungen“ in den Ergebn. exakt. Naturwiss. 20 [1942].