

auch durch die Nieren durchtretend in den Urin gelangen. Darnach schiene es denn, als ob die Glomerulushaut für pathogene Pilze durchgängig wäre. Indessen ist diese für unsere ganze Auffassung der Eliminirung der Infektionsstoffe aus dem Körper nicht weniger, als für das uns speciell beschäftigende Thema höchst wichtige Frage meines Erachtens durchaus noch nicht spruchreif. Im Gegentheil spricht hier bis jetzt noch Manches gegen die Richtigkeit der unseren Anschauungen über das Eliminirungsbestreben des Organismus in Infektionskrankheiten so sehr conformen Ansicht, dass die pathogenen Pilze durch die Glomerulushaut ausgeschieden werden.

Die Möglichkeit, dass speciell harnstoffzersetzende Pilzkeime unter pathologischen Verhältnissen vom Blute her durch die Glomerulushaut durchtreten und so „Spontanzersehung“ des Urins bewirken, kann, so wie die Dinge heute stehen, nicht geleugnet werden, aber der sichere, jeden Zweifel auch für unser durch die bakteriologischen Untersuchungsmethoden der jüngsten Zeit geläutertes Urtheil ausschliessende Beweis steht, dünke ich, bis jetzt noch aus. Es ist daher wohl richtig, vor der Hand an der alten durch unzweifelhafte Thatfachen und Experimente gestützten Anschauung festzuhalten, dass überall da, wo eine scheinbar spontane Zersetzung des Urins beobachtet wird, die diese bewirkenden Pilze, bei sonstigem Mangel der Communication der Harnwege mit der äusseren Luft, durch die Urethra in die Harnblase eingedrungen sind, wobei zugegeben werden muss, dass die katarrhalische Affection der Harnwege dem Eindringen, der Entwicklung und Wirkung jener Pilze Vor-schub leistet.

II. Ueber die zur Anstellung von Harnstoffzersehungsversuchen nothwendigen Versuchsanordnungen.

Die beiden Haupterfordernisse für die Anstellung fehlerfreier Zersetzungsversuche sind erstens die Gewinnung von Reinculturen der auf ihre harnstoffzerlegende Wirksamkeit zu prüfenden Pilze und zweitens die Herstellung sicher sterilisirter, absolut keimfreier und andererseits die Entfaltung der Wirkung der Mikroorganismen gestattender Harnstofflösungen. Ueber die Art und

Weise wie das erste der beiden Desiderate erfüllt wurde, soll in einem eigenen Capitel, welches zugleich von der Biologie der harnstoffzersetzenden Pilze handelt, das Nähere mitgetheilt werden. Ausser den Reinculturen ist aber nicht minder wichtig die Herstellung zu den Versuchen passender Harnstofflösungen.

Erstes Erforderniss für diesen Zweck ist die Beschaffung chemisch reinen Harnstoffs. Der aus der Fabrik bezogene „reine“ Harnstoff ist nicht rein, enthält vielmehr immer mehr oder weniger grosse Mengen von Ammoniak, wie ein Zusatz von Nessler'schem Reagens zu Auflösungen solchen Harnstoffs zur Evidenz beweist. Der Harnstoff muss daher erst gereinigt, d. h. ammoni-frei gemacht werden, damit nicht die Beurtheilung, ob Spuren von Harnstoff während des Versuchs in Folge der Pilzwirkung zersetzt wurden oder nicht, durch jene Unreinheit des Harnstoffs beeinträchtigt ist. Dies geschieht am besten auf folgende Weise:

Um den Harnstoff vollständig von Ammoniak (cyansaurem Ammoniak) zu befreien, führt man ihn passender Weise erst in Nitrat über, krystallisirt dieses einige Male aus Salpetersäure um und verwandelt das reine Nitrat wieder in Harnstoff, indem man die Salpetersäure an Baryt bindet, den überschüssigen Baryt mit Kohlensäure fällt, das Filtrat vom Bariumcarbonat zur Trockene eindampft und dem zurückbleibenden Gemenge von Harnstoff und Bariumnitrat den ersteren durch heissen Alkohol entzieht. Nach dem nochmaligen Umkrystallisiren aus Alkohol und nach sorgfältigem Trocknen auf dem Wasserbad erweist sich der Harnstoff absolut ammoniakfrei. Derselbe kann nunmehr zu den Versuchen verwandt werden.

Da nicht sorgfältig ausgekochte Gläser der in ihnen enthaltenen Flüssigkeit alkalische Reaction zu geben pflegen und der Harnstoff in alkalischen Flüssigkeiten anerkannt leicht in kohlen-saures Ammon zerfällt, so dürfen zu allen Zersetzungsversuchen nur tagelang ausgekochte Glaskolben benutzt werden.

Die Sterilisirung der Harnstofflösungen konnte auf 2 Wegen versucht werden. Die gewöhnlichste Methode der Sterilisirung von Flüssigkeiten ist bekanntlich eine Erhitzung derselben

über 100° mittelst des Digestors. Diese Methode ist aber für unsere Zwecke leider unbrauchbar, da der Harnstoff hierbei durch die Höhe der Temperatur in kohlensaures Ammonium zerfällt. Es ist dies ein bekanntes Factum, indessen geschieht die Zersetzung auch schon bei 100° , ja zwischen 80° — 90° , sobald die Harnstofflösung einige Zeit ($\frac{1}{4}$ Stunde genügt) auf dieser Temperatur gehalten wird, während eine ebenso lange auf circa 60° erhitze Harnstofflösung unzersetzt bleibt. Prüft man 2 Proben, deren eine auf 80° — 90° , die andere auf 60° erhitzt war, nach dem Erkalten mit Nessler's Reagens, so tritt in letzterer Probe keine Reaction ein, in ersterer entsteht beim Zusatz des Reagens zwar auch nicht sofort der bekannte gelbbraune Niederschlag, vielmehr dauert es circa 1 Minute bis die Flüssigkeit anfängt sich zu trüben, dann aber rasch gelb zu werden. Dieses Versuchsergebnis ist wohl so zu deuten, dass in einer wässrigen Harnstofflösung bei einer Temperatur von 80° die Harnstoffmoleküle allmählich gelockert werden, so dass das zugesetzte alkalische Nessler'sche Reagens im Stande ist, die Umsetzung des Harnstoffs in kohlensaures Ammon rasch zu vollenden und die bekannte Reaction zu bewirken.

Darnach sind nun aber auch alle Versuche, in welchen auf diese Zersetzbarkeit des Harnstoffs bei höheren Temperaturen (80° — 100°) keine Rücksicht genommen wird, zur Feststellung der zersetzenden Wirkung von Pilzen auf Harnstofflösungen nicht entscheidend, weil ja hierbei die letzteren schon vor dem Einbringen der zum Versuch benutzten Pilze künstlich ammoniakhaltig gemacht werden. Dagegen war nach obigem Versuchsergebnis zu erwarten, dass eine Sterilisierungsmethode, welche nicht über 60° Erhitzung verlangt, zum gewünschten Ziel führen werde. Eine solche besitzen wir in der von R. Koch für die Sterilisierung des Blutserums angegebenen discontinuirlichen Erwärmung, die darin besteht, dass die Flüssigkeit 5—6 Tage lang täglich 1 Stunde lang auf 60° erhitzt wird. Allein gleich der erste Versuch zeigte, dass auch damit eine Sterilisierung der Harnstoffsolution ohne Ammoniakbildung nicht möglich ist, indem die stundenlange Erwärmung der Harnstofflösungen dieselbe Zerlegung des Harnstoffs in kohlen-

saures Ammonium zu Stande bringt, wie die kurz-dauernde Erhitzung auf 80° .

Dagegen hält der trocken erhitzte Harnstoff viel höhere Temperaturen aus, ohne auch nur Spuren des Zerfalls zu zeigen; speciell kann er ohne Schaden über $\frac{1}{2}$ Stunde lang auf 106° erhitzt werden. Und ebenso können wässrige Harnstofflösungen unbestimmt lange zwischen 30° und 40° ohne Ammoniakbildung gehalten werden, so dass Versuchen über die Pilzwirkung bei Verdauungstemperatur in der leichten Zersetzlichkeit des Harnstoffs kein Hinderniss erwächst.

Auf Grund der voranstehenden Erfahrungen nun habe ich mich bei meinen Versuchen folgender Methode der Herstellung und Sterilisirung von Versuchsflüssigkeiten bedient:

Sorgfältig ausgekochte Glaskolben werden mit 150 ccm v. Jaksch'scher¹⁾ Nährlösung gefüllt, mit Watte dicht verschlossen und im Digestor über eine halbe Stunde lang auf 106° erhitzt. In ein ebenfalls auf 106° erhitztes mit 50 Wasser gefülltes graduirtes Standgefäß, das mit einem Wattepfropf verschlossen ist, wird nach dem Erkalten unter momentaner Lüftung des letzteren die entsprechende Menge trocken auf 106° seinerzeit erhitzt gewesenen Harnstoffs (das Gefäß natürlich ebenfalls mit Watte pilzdicht verschlossen) mittelst eines vorher geglühten Platinspatels eingetragen. Von dieser sterilisirten Harnstofflösung werden dann rasch in die bereitstehenden (erkalteten) Nährflüssigkeiten ungefähr gleiche Mengen eingegossen. Die „Probeflüssigkeiten“ sind damit fertig gestellt und kann nunmehr die Impfung mit den auf ihre Wirksamkeit zu untersuchenden Pilzen in der gewöhnlichen Weise (mit dem geglühten Platindraht) vollzogen werden. Einer der Glaskolben bleibt zur Controle ungeimpft. Bevor die geimpfte Probeflüssigkeiten in den Verdauungsschrank gestellt werden, wird in sämtlichen Proben (je 15 — 20 ccm zu 2 — 3 ccm frisch bereiteten Nessler'schen Reagens geschüttet) erst die Abwesenheit von Ammoniak

¹⁾ von Jaksch hat durch sorgfältige Versuche als bestes Nährmaterial für die Harnstoffpilze folgende Zusammensetzung der Nährflüssigkeit gefunden: auf 1 l Wasser $\frac{1}{8}$ g saures phosphorsaures Kali, $\frac{1}{16}$ g schwefelsaure Magnesia, 5 g Seignettesalz (3 g Harnstoff). Zeitschr. für physiol. Chemie Bd. V. S. 395. 401. 1881.

constatirt. Nachdem die Probeflüssigkeiten je nach dem Zweck des Versuchs 1—3 Tage im Verdauungsschrank verweilt haben, werden sie nach dem Erkalten auf ihren Ammoniakgehalt in der eben angegebenen Weise untersucht, d. h. zu 2—3 den Boden des Reagenzglases bedeckenden Cubikcentimetern Nessler'schen Reagens werden 15—20 ccm der auf Ammoniak zu prüfenden Flüssigkeit zugesetzt. Ist Ammoniak darin enthalten, so entsteht der bekannte gelbe, oder bei stärkerem Ammoniakgehalt rothbraune Niederschlag. Ich habe diese von mir benutzte Methode der Bereitung der Probeflüssigkeiten und Anstellung der Reactionen so genau beschrieben, weil, wie ich mich überzeugte, Abweichungen von obigem Verfahren leicht zu Versuchsfehlern Veranlassung geben. Die Controlflüssigkeiten erwiesen sich stets als ammoniakfrei; blieb die mit einem auf seine Wirksamkeit zu untersuchenden Pilz geimpfte Probeflüssigkeit selbst nach 3tägigem Verweilen im Verdauungsschrank ammoniakfrei, so wurde diese specielle Pilzart für „unwirksam“ erklärt. Die gleich zu beschreibenden „wirksamen“ Pilze entwickelten meist schon nach kurzer Zeit (6—48 Stunden) beträchtliche Mengen von Ammoniak. Die blosse Trübung der Probeflüssigkeit während der mehrtägigen Prüfungszeit lässt im Voraus keinen Schluss zu auf die zu erwartende Wirksamkeit der geimpften Pilze; offenbar wachsen auch einzelne auf Harnstoff absolut nicht wirkende Pilzarten in der von mir benutzten Nährflüssigkeit enorm stark und geben jedesmal der Probeflüssigkeit ein förmlich milchiges Aussehen, ohne auch nur Spuren von Harnstoff trotz ihrer lebhaften Entwicklung zu zersetzen.

Diese Details der Herstellung der Probeflüssigkeiten und Reactionen mussten im Allgemeinen festgestellt sein, ehe ich daran gehen konnte, die vorgezüchteten Pilzarten auf ihre Wirksamkeit zu prüfen.

Was die einzelnen zur Prüfung verwandten Pilzarten betrifft, so concentrirte sich mein Interesse natürlich auf die aus zersetztem Harn gewonnenen Pilze, deren Beschreibung ein besonderes Capitel gewidmet sein soll. Daneben habe ich auch einige Versuche mit anderen Pilzen gemacht, deren Resultat, soweit es allgemeineres Interesse hat, hier kurz angeführt sein soll:

Unwirksam erwies sich der von Hauser unlängst entdeckte die Erscheinungen der Fäulniss in eminentem Grad hervorrufende Pilz „Proteus“. Es war mir dies ein besonders auffallendes Resultat, da diese Pilzart nach ihren sonstigen auf organische Substanzen stark zersetzend wirkenden Eigenschaften von vornherein speciell geeignet erschien, auch die Harnstoffzersetzung zu bewirken. Es wird daher auch, wie ich glaube, gerathen sein, vorderhand die alkalische Gährung des Urins nicht ohne Weiteres mit dem Prozess der Fäulniss zu identificiren, bis wir in die Einzelheiten des Fäulnissprozesses noch klareren Einblick gewonnen haben, und dürfte vorerst der Name „ammoniakalische Gährung“ des Urins der daneben vielfach gebrauchten Bezeichnung „Fäulniss“ des Harns vorzuziehen sein.

Dagegen zeigten sich wirksam:

1. Culturen von Lungsensarcine; dieselben zerlegten bei jedem Versuch den Harnstoff rasch (gewöhnlich schon nach wenigen Stunden) und energisch in kohlsaures Ammonium.

2. Pilzculturen, welche aus der Luft des Laboratoriums gewonnen wurden (s. o.).

Die Züchtung der letzteren, sowie der aus zersetztem Urin gewonnenen Pilze wurde von mir mit dem derzeitigen I. Assistenten meiner Klinik Dr. E. Graser vorgenommen. Die hierbei gewonnenen Resultate sind daher im folgenden Abschnitt unter unserem gemeinschaftlichen Namen publicirt.

III. Ueber die harnstoffzersetzenden Pilze im Urin.

Von Prof. W. Leube und Dr. E. Graser.

Ehe wir zur Beschreibung der einzelnen den Harnstoff zersetzenden Pilzarten gehen, wollen wir die Art und Weise auf welche wir dieselbe gewannen und weiterzüchteten, in Kürze angeben. Wir könnten uns hier zwar sehr kurz fassen, indem wir einfach erklärten, die Züchtung sei nach der „Koch'schen Methode“ vorgenommen worden. Indessen hat die Erfahrung der jüngsten in dieser Hinsicht so productiven Zeit gelehrt, dass die Koch'sche Methode schlechthin doch von Einzelnen recht verschieden aufgefasst wird, so dass es nicht überflüssig, ja so-