

in die Tiefe wuchern. In den Impfkanal greift nur ein ganz dünner Streifen herein. Die Cultur sieht exquisit matt aus, etwa wie ein noch nicht erstarrter Stearin tropfen leicht durchscheinend. Der Pilzrasen bildet eine ziemlich trockene, wenig cohärente Masse. Die Gelatine wird nicht verflüssigt. Einen besonderen Geruch entwickeln diese Pilze nicht.

Die voranstehende Beschreibung characterisirt die Lungsarcine hinlänglich in Bezug auf ihr Culturen wachsthum und ihr mikroskopisches Verhalten, so dass Verwechslungen mit dem *Micrococcus ureae*, dessen Einzelindividuen allerdings zuweilen in Tetradenform zusammen gelagert erscheinen, wohl kaum jemals möglich sind. Mehrfach gelang es uns übrigens im zersetzen Urin diese Sarcineform nachzuweisen, und konnten auch hiervon Reinculturen gezüchtet werden. Ob die Anwesenheit der sog. Lungensarcine im zersetzen Urin häufig, ob sie bei der gewöhnlichen Harnzerstzung eine Rolle spielt? Wir bezweifeln beides. Wahrscheinlich rührte der mehrfache Fund von Sarcine im zersetzen Urin einfach davon her, dass in unserem Laboratorium eine Zeit lang viel mit der betreffenden Sarcineart gearbeitet worden war, und deswegen in der Luft wohl mehr Keime davon suspendirt waren, als sonst in derselben enthalten zu sein pflegen.

IV. Ueber die Frage nach der Existenz eines ungeformten harnstoffzersetzenden Ferments.

Im Jahre 1874 wies *Musculus*¹⁾ nach, dass man bei der Filtration alkalisch gährenden Urins im Filter ein harnstoffumsetzendes Ferment fixiren kann. Das Filter mit Wasser ausgewaschen, bis es nicht mehr alkalisch reagirt und bei ginder Wärme getrocknet, konnte als empfindliches Reagens auf Harnstoff benutzt werden, indem sich das aus dem Filter gewonnene mit Curcuma gefärbte Papier beim Eintauchen in eine Harnstofflösung durch Ammoniakbildung bräunte. Als Ursache dieses Verhaltens nahm *Musculus* zuerst das Wiederaufleben der getrockneten *Torulaceen* an, wie denn auch die mikroskopi-

¹⁾ Comptes rendus T. LXXVIII. Jan. 1874.

sche Untersuchung eine Masse Pilze ergab, sobald das Papier mit Wasser zusammengebracht wurde.

Dieser ersten Mittheilung von Musculus folgte kurz darauf (1876) eine höchst interessante Vervollständigung dieser Entdeckung durch denselben Forscher¹⁾. Er fand, dass der Harn von Blasenkatarrhkranken besonders reich an Ferment war. Wurde solcher Harn mit starkem Alkohol versetzt, so fiel dadurch das Ferment mit dem Schleim als Niederschlag aus, welcher abfiltrirt und getrocknet wurde. In dem getrockneten Schleim fehlten Pilze, denen man seit Pasteur's Untersuchungen die Zersetzung des Harnstoffs zuschrieb. Der pulverisirte und mit Wasser ausgezogene Rückstand liess durch das Filter anfangs eine trübe Flüssigkeit durchtreten, welche sich mehr und mehr klärte. Diese Flüssigkeit zersetzte den Harnstoff sehr rasch in kohlensaures Ammonium und verhielt sich in allen Stücken ähnlich anderen ungeformten Fermenten. Darnach schien entsprechend der alten Anschauung der Blasenschleim als Ferment zu wirken bezw. dasselbe zu enthalten.

Diese mit Recht das grösste Aufsehen erregende Thatsache wurde dann von Joubert und Pasteur²⁾ controlirt. Sie bestätigten den Musculus'schen Fund eines löslichen, also ungeformten harnstoffzersetzenden Ferments. Indessen sollte dieses Ferment nach Pasteur lediglich das Product der Pilze sein, da in jedem zersetzen Urin, wie die früheren Untersuchungen ergeben haben, Bakterien nachweisbar sind, andererseits Pilze, in eine weder Blasenschleim noch Harnstoff enthaltende Nährflüssigkeit implantirt, sich vermehren und lösliches Ferment erzeugen können, das nach dem Musculus'schen Verfahren isolirt den Harnstoff in Ammoniak umsetzt.

Es ist wohl ohne Weiteres klar, wie wichtig diese Thatsachen nicht blos für die Frage der Harnzerstzung waren, sondern vor Allem welche principielle Bedeutung dieselben für die Pilzwirkung und Fermentbildung im Allgemeinen beanspruchen könnten. Es schien damit der Beweis geliefert, dass von Mikroorganismen das Product ihrer Thätigkeit isolirt werden kann

¹⁾ Comptes rendus T. LXXXII. p. 333. 1876.

²⁾ Ibid. T. LXXXIII. p. 1. 1876.

und das letztere als ungeformtes Ferment, unabhängig von jenen kleinsten Lebewesen, die es erzeugen, weiter zu wirken im Stande ist. Welche Tragweite kommt diesen Thatsachen und Anschauungen für unsere Vorstellungen von der Gährung zu! Wäre doch damit die Wirkungsweise der Fermentorganismen wenigstens insoweit klargestellt, als, soll die Fermentwirkung sich entfalten, erst als Mittelglied in der Wirkung die Bildung eines löslichen ungeformten Fermentstoffes erfolgen müsste! Aber noch weit bedeutungsvoller ist die geradezu ungemesse Perspektive, die auf der Basis jener letztgenannten Pasteur'schen Versuchsresultate und Schlussfolgerungen für die Pathologie sich entwickeln könnte! Wie wichtig der Nachweis von Pilzen in den einzelnen Krankheiten für die Auffassung des Wesens der letzteren geworden ist, bedarf heutzutage, wo Entdeckung auf Entdeckung in diesem Gebiete sich häuft, kaum der Andeutung. Indessen darf ja nicht vergessen werden, dass mit der Auffindung jener pathogenen Pilze immer nur im besten Falle die anatomische Basis der Krankheitsursache festgestellt ist, dass aber die Wirkung derselben im Organismus damit noch keineswegs klar ist. Denn wenn auch die Ueberschwemmung des Organismus mit jenen kleinsten Eindringlingen im einzelnen Fall die weite Verbreitung der Krankheitsursache im Körper documentirt, so bleiben doch bei alledem die Wirkungen jener Pilze auf den Stoffwechsel und die davon abhängigen specifischen Krankheitserscheinungen völlig unerklärt! Hier müssen, wenn den Pilzen, woran doch nach den Entdeckungen der letzten Jahrzehnte füglich nicht mehr gezweifelt werden darf, eine bevorzugte Rolle im Krankheitsprozess zufällt, chemische Vorgänge mitspielen. Sie aufzudecken, muss das nächste Ziel der Chemie und experimentellen Pathologie sein und in dieser Beziehung wäre mit obiger Entdeckung ein besonders wichtiger Schritt gemacht worden, weil hier nicht nur ein chemischer Stoff, sondern ein ungeformtes, extracellulär weiterwirkendes Ferment als Product der Pilzthätigkeit erkannt wäre.

Diese Ueberlegungen waren es wenigstens zum Theil, welche mich bestimmten, auf die Frage der Bildung eines ungeformten Ferments durch die Thätigkeit der harnstoffzersetzenden Pilze im Anschluss an die obigen Befunde mit Hülfe des Experiments

einzu gehen. Nachdem es uns gelungen war, mehrere sicher isolirbare Pilzarten aus zersetzttem Urin reinzuzüchten und ihre Einwirkung auf Harnstofflösungen nach den von mir angegebenen Methoden zu studiren, war die Hoffnung gegeben, das fragliche Ferment von den Pilzen ohne Schwierigkeit trennen und seine Bildung näher erforschen zu können. Denn die durch die oben beschriebenen Befunde geschaffenen Versuchsverhältnisse waren, wie ich mir sagen durfte, doch wesentlich einfacher und durchsichtiger, als bei der Abtrennung jenes Ferments aus faulendem Urin, wie sie seinerzeit vorgenommen worden war.

Die von Musculus angegebene und auch von Joubert und Pasteur benutzte Methode der Fermentisolirung konnte nicht befolgt werden, da hierbei Verunreinigungen der fraglichen Fermentflüssigkeit mit (Luft-) Pilzen, wie leicht zu constatiren ist, unvermeidlich sind. Dagegen gelingt die Entfernung der Pilze aus einer Harnstofflösung, in welcher sie die Umsetzung des Harnstoffs in kohlensaures Ammon zu Stande gebracht haben, jedes Mal sicher und vollständig (auch kommt eine Beimischung von Pilzen aus der Luft während jener Procedur nie vor), wenn man die Pilzharnstofflösung durch Thoncylinger unter gewissen Cautelen filtrirt.

Die circa 50 ccm haltenden Thoncylinger werden an ihrem obersten glasirten Ende mit Watte fest umwickelt und in einen Glasylinder gesteckt, so dass der Wattepropf mit dem durch ihn gehenden Thoncylinger fest im Glasylinder steckt und der Thoncylinger in letzteren zum grössten Theil hineinragt. Von dem unteren Ende des Glasylinders gehen seitlich 2 Glasmäntel ab, von denen eine am freien Ende offen bezw. mit einem Wattepropf versehen ist, die andere in eine leicht abzubrechende Spitze ausgezogen ist. Der so vorbereitete Filtrationsapparat wird bei 160° sterilisiert und unmittelbar nach dem Erkalten mit einer Kautschoukkappe verschlossen, welche in der Mitte dem freien Ende des Thoncylders entsprechend mit einem kleinen Loch versehen ist. Die offene, mit Wattepropf versehene seitliche Glasmäntel des Filtrationsapparates wird nun mit dem Bunsen'schen Aspirator in Verbindung gesetzt, die Pilzharnstofflösung eingefüllt und der Aspirator in Thätigkeit gesetzt. Bei gutem Schluss des Aspirators wird sofort die Kautschoukkappe

gegen den Wattepfropf fest angezogen und erscheint die Flüssigkeit in kleinsten thauartigen Tröpfchen auf der ganzen Aussenfläche des Thoncylinders.

Der Gang der mit solchen Filtrationsapparaten angestellten Versuche war folgender:

Nachdem in eine Harnstoffprobeflüssigkeit eine wirksame Pilzart mit den bekannten Cautelen (s. Cap. II) eingebracht und nach einem Tag Verweilens derselben im Verdauungsschrank die Zersetzung des Harnstoffs, d. h. die ammoniakalische Reaction deutlich ausgesprochen war, wurde die in Gährung begriffene Flüssigkeit in den sterilisierten Filtrationsapparat eingegossen und abgesaugt. Von dem nach circa 6 Stunden¹⁾ am Boden des Glas cylinders sich ansammelnden wasserklaren Filtrat wurden durch die an der Spitze abgebrochene seitliche Glasröhre unter den nöthigen Cautelen zwei Proben in zwei mit Nährgelatine beschickte sterilisierte Reagensgläser, weiterhin je circa 1 ccm in 2 sterilisierte (mit Nährsalzen versogene) Harnstoffprobeflüssigkeiten gebracht und letztere 60 Stunden lang bei einer Temperatur von 30°—40° gehalten. Vor Einbringen der Probeflüssigkeiten in den Verdauungsschrank muss auf einen etwaigen Ammoniakgehalt derselben geprüft werden. Gewöhnlich verschwindet das NH₃ grösstentheils während des Absaugens, so dass das Filtrat zur Anstellung des Fermentversuchs ohne Weiteres benutzt werden kann. Ist dies nicht der Fall, so muss von der Benutzung dieses Filtrats abgestanden werden.

Die Prüfung der Flüssigkeiten ergab nun, nachdem sie 2—3 Tage im Verdauungsschrank geblieben waren, dass sie keine Spur von Ammoniak enthielten. Zur Vorsicht wurden davon noch 2 Proben auf Nährgelatine gebracht; dieselben entwickelten nach 1 Woche keine Pilze, ebenso wenig die oben genannten vom Filtrat stammenden Impfproben.

Der im Voranstehenden beschriebene Modus procedendi ist etwas umständlich. Ich habe mich indessen überzeugt, dass jede einfachere Versuchsanordnung zu Fehlern führt und dass bei nicht ganz minutioser Vermeidung der Möglichkeit des Eindringens

¹⁾ In einem eigens dazu angestellten Versuche wurde die Absaugung 3 volle Tage fortgesetzt. Das dabei gewonnene Resultat unterschied sich von den im Text geschilderten Versuchsergebnissen in keiner Weise.

von Pilzen aus der Luft in die betreffenden Versuchsflüssigkeiten Harnstoff umgesetzt und Fermentwirkung vorgetäuscht werden kann. In solchen Fällen ist aber sehr leicht durch die obigen Impfversuche die Anwesenheit von Pilzen in den Versuchsflüssigkeiten zu constatiren.

Meine ersten Versuche fielen theils positiv, theils negativ aus; erst als die Methode ganz fehlerfrei ausgebildet war, gaben alle Experimente hinter einander in Bezug auf die Ammoniakreaction und die Anwesenheit von Pilzen regelmässig dasselbe negative Resultat.

Von Pilzen wurden zum Versuch verwandt theils die harnstoffzerlegenden Pilze, die aus zersetzm Urin gewonnen waren, theils die an fermentativer Eigenschaft jenen nicht nachstehende Sarcine. Das Endresultat war hinsichtlich der Frage nach der Bildung eines ungeformten Ferments durch die Pilzwirkung dasselbe negative, gleichgültig ob dieser oder jener der genannten Pilze zur Verwendung kam.

Man könnte vielleicht einwerfen, dass das fragliche von den Pilzen gelieferte Ferment bei der Filtration im Thoncylinder stecken geblieben sei und so sich der Extraction aus der Gährungsflüssigkeit entzogen habe. Ich bezweifle, dass Jemand im Ernst diesen Einwand machen wollen, zumal wir wissen, dass andere ungeformte Fermente ja ohne allen Anstand die Wand des Thoncylinders passiren.

Nach alle dem glaube ich das Resultat meiner Versuche über die Bildung eines ungeformten Ferments bei der harnstoffzersetzen Thätigkeit der Pilze dahin zusammenfassen zu können, dass es nicht gelingt, ein ungeformtes, harnstoffspaltendes Ferment von den die Harnstoffzerlegung bewirkenden Pilzen zu trennen. Und weiterhin glaube ich mich zu dem Schlusse berechtigt, dass die specifische, freilich bis jetzt nicht näher definirbare Lebensthätigkeit verschiedener in Reincultur gewinnbarer Pilze die Harnstoffzersetzung zu Stande bringt, nicht ein von denselben dabei geliefertes ungeformtes Ferment, welches unabhängig von ihnen weiterhin Harnstoff in kohlensaures Ammonium zu verwandeln vermöchte.

Damit soll nicht geleugnet werden, dass aus schleim-

haltigem zersetzttem Urin ein in Wasser lösliches Ferment gewonnen werden kann, wie dies thatsächlich *Musculus* seinerzeit gelang. Nur ist es nach dem Resultat meiner Versuche nicht erlaubt, die Annahme zu machen, es handle sich in solchen Fällen um ein von den im zersetzten Urin vorfindlichen Pilzen geliefertes und von diesen abtrennbares Ferment, was bei der Erfahrung, dass im zersetzten Urin Pilze bis jetzt nie vermisst wurden, allerdings die nächstliegende Schlussfolgerung wäre. Thatsächlich ist das aber nicht der Fall. Findet sich also im schleimhaltigen zersetzten Urin neben den Pilzen ein sicher nachweisbares, isolirbares, ungeformtes Ferment, so dürfte dieses nach Obigem folgerichtig eine andere Quelle haben, deren Auffindung die Aufgabe specieller späterer Untersuchungen sein muss.

Erklärung der Abbildungen.

Tafel XXIII.

- Fig. 1. Photographische Abbildung des harnstoffzerlegenden *Bacterium ureae* aus zersetzttem Urin gewonnen.
 - Fig. 2. Desgl. von *Micrococcus ureae* aus Urin gewonnen.
 - Fig. 2 a. - - - *Micrococcus ureae* aus der Luft gezüchtet.
 - Fig. 3. Kleinste aus zersetzttem Urin gewonnene harnstoffzersetzende Stäbchen in photographischer Abbildung.
-