

## Studien über den Harnstoffpilz.

Von Dr. **Rudolf v. Jaksch**, Assistenten der I. medicinischen Klinik.

(Hierzu Tafel I).

(Aus dem medicinisch-chemischen Laboratorium in Prag).

(Der Redaktion zugegangen am 15. August 1881).

Pasteur<sup>1)</sup> gebührt das Verdienst zuerst die Aufmerksamkeit der Forscher auf die bei der alkalischen Gährung des Harns auftretenden Mikroorganismen gelenkt zu haben. Er entdeckte in einem von ihm als *Torulacee* bezeichneten Pilz das Ferment der alkalischen Harngährung. Van Tieghem<sup>2)</sup> hat diese Angaben bestätigt und unsere Kenntnisse durch neue Thatsachen bereichert. Er fand, dass sich die *Torulacee* in Hefewasser, in welchem Harnstoff gelöst ist, gut entwickelt, dass in einer reinen Harnstofflösung zwar die Gährung beginnt, aber sehr träge fortschreitet und in kurzer Zeit ganz aufhört. Er wies ferner nach, dass in einer derartig inficirten Lösung von Harnstoff in Hefewasser der Harnstoff durch das Ferment in 36 Stunden vollständig in kohlen-saures Ammoniak umgesetzt wurde.

Musculus<sup>3)</sup> gelang es, aus faulendem Harn ein lösliches Ferment zu gewinnen, welches im Stande war, Harnstoff in kohlen-saures Ammoniak überzuführen, eine Beob-

---

<sup>1)</sup> L. Pasteur: *Annales de chimie et de physique* 1862, pag. 52 et 55. — Mémoire sur les corpuscules organisés qui existent en suspension dans l'atmosphère. Vergleiche *Comptes rendus* LII, p. 1142.

<sup>2)</sup> Van Tieghem: *Sur la fermentation ammoniacale*, *Comptes rendus* T. LVIII, p. 210, 1864.

<sup>3)</sup> Musculus: *Ueber die Gährung des Harnstoffs*. — *Pflüger's Archiv*, Bd. XII, S. 214.

achtung, die von Pasteur und Joubert<sup>4)</sup> bestätigt und dahin erweitert wurde, dass dieses Ferment dem Lebensprocesse des Pilzes seinen Ursprung verdankt.

In Anschluss an die Untersuchungen der genannten Forscher habe ich in einer Reihe von Versuchen, deren Ergebnisse ich hier mittheile, Näheres über die biologischen Verhältnisse des Harnstoffpilzes festzustellen versucht. Hierzu bedurfte es einer Reincultur des Pilzes, zu welcher ich in folgender Weise gelangte.

### Methode der Züchtung.

Eine geringe Menge faulenden Harns, der die von Pasteur und Van Tieghem beschriebenen Pilze in reichlichster Menge zeigte, wurde auf eine Harnstoff enthaltende Nährlösung gebracht, von der erhaltenen Pilzvegetation eine Spur auf eine ebensolche Nährlösung ausgesät und mit dieser täglich wiederholten Ueberimpfung so lange fortgefahren, bis die wochenlang fortgesetzte tägliche mikroskopische Untersuchung der Pilze eine vollständige Homogenität des Pilzmaterials auswies.

Sorgfältig gereinigte, ungefähr 150 Cc. Flüssigkeit fassende Kölbchen wurden mit 50 Cc. einer Nährlösung gefüllt, welche im Liter enthielt:  $\frac{1}{16}$  gr. schwefelsaure Magnesia,  $\frac{1}{8}$  gr. saures, phosphorsaures Kali, 5 gr. Kalium-Natrium-Tartrat und 5 gr. Harnstoff<sup>1)</sup>; die Flüssigkeit wurde auf dem Sandbad aufgeköcht,  $\frac{1}{2}$  Stunde im Sieden erhalten und die Kölbchen, während die Flüssigkeit sich noch im lebhaftesten Sieden befand, mit einem Pfropf entfetteter Watte verschlossen.

<sup>4)</sup> Pasteur u. Joubert: Sur la fermentation de l'urine. Comptes rendus, T. LXXXIII, 1876, p. 5.

<sup>1)</sup> Warum diese Zusammensetzung der Flüssigkeit gewählt wurde, wird aus den später mitgetheilten Versuchen klar werden. Bevor ich zu dieser Zusammensetzung der Nährlösung gelangte, also in den ersten Versuchsreihen (ungefähr 20 Culturen), benutzte ich eine Lösung, die im Liter enthielt:  $\frac{1}{4}$  gr. salpetersauren Kalk,  $\frac{1}{16}$  gr. salpetersaures Kali,  $\frac{1}{16}$  gr. schwefelsaure Magnesia,  $\frac{1}{16}$  gr. saures phosphorsaures Kali, 5 gr. Seignettesalz und 5 gr. Harnstoff.

Nachdem die Flüssigkeit Zimmertemperatur angenommen hatte, wurde sie in folgender Weise mit dem Pilz inficirt. Haardünne, frisch ausgezogene, an beiden Enden zugeschmolzene Glasröhrchen wurden in eine in lebhafter Harnstoffgährung begriffene Flüssigkeit eingestossen, so dass die untere eingetauchte Spitze abbrach und eine Spur der Pilzflüssigkeit in das Capillarröhrchen eintrat. Dieses wurde sofort in die zu impfende Nährlösung, von der auf einen Augenblick der Wattepfropf entfernt wurde, gebracht und der die Pilzflüssigkeit enthaltende Theil durch Anstossen an den Boden des Kochfläschchen abgebrochen und dasselbe neuerdings mit einem frischen Wattepfropf verschlossen.

Um sicher zu sein, dass bei diesem Verfahren andere Pilzkeime (aus der Luft) nicht in die Nährlösung gelangen, wurde stets mit Controlversuchen gearbeitet, in der Art, dass in genau die gleiche Nährflüssigkeit enthaltende Kölbchen auf die oben geschilderte Weise Capillarröhrchen hineingebracht wurden, nur mit dem Unterschiede, dass dieselben nicht unter Pilzflüssigkeiten, sondern unter ausgekochtem und dann auf Zimmertemperatur gebrachten Wasser abgebrochen worden waren.

Die nach Hunderten zählenden Controlversuche fielen sämmtlich negativ aus, so dass man wohl berechtigt ist eine zufällige Infection durch andere als die absichtlich eingebrachten Pilze vollständig auszuschliessen.

Alle geimpften Flüssigkeiten, sowie auch die Controlversuche wurden stets unter ganz gleiche äussere Bedingungen gebracht, d. h. bei einer Temperatur von 30° C. tage- oder wochenlang gehalten.

### Verlauf der Gährung.

Die auf die oben beschriebene Weise inficirten Flüssigkeiten zeigten nach 24 stündigem Stehen bei 30° C. jedesmal eine intensive Trübung, die in den folgenden Tagen noch zunahm. Dabei hatten die Lösungen eine leicht grüne Farbe gewonnen und fluorescirten etwas. Nach Verlauf im Durchschnitt von 14 Tagen setzten sich am Boden kleine Wölkchen

ab, doch blieb die Flüssigkeit total trüb. Sie reagierte stark alkalisch und enthielt eine grosse Menge Kohlensäure.

Nach mehrmonatlichem Stehen klärte sie sich vollkommen und am Boden fand sich eine mehrere Millimeter hohe, schleimige, aus *Micrococcus ureæ*-Rasen bestehende Schicht vor.

Wurde aus 4—6 Wochen alten Culturen auf eine frische Nährlösung geimpft, so blieb letztere steril.

### Einfluss der Temperatur auf die Entwicklung des Harnstoffpilzes.

Um den Einfluss der Temperatur auf die Entwicklung des Pilzes festzustellen, wurden folgende Versuche unternommen.

Eine entsprechende Anzahl von Kölbchen wurde mit 50 Cc. unserer gewöhnlichen Nährlösung gefüllt, die eine Hälfte davon unter den oben beschriebenen Cautelen geimpft; die andere Hälfte diente zu Controlversuchen. Die Culturflüssigkeiten wurden dann der Einwirkung verschiedener Temperaturgrade ausgesetzt und zwar:

1. Einer Temperatur von  $-15^{\circ}$  C. durch 24 Stunden: die Flüssigkeit ist nach dem Aufthauen klar, 24 Stunden später ist bei Zimmertemperatur eine schwache Trübung aufgetreten, die in den folgenden Tagen rasch an Intensität zunimmt.
2. Einer Temperatur von  $-15^{\circ}$  C. durch 6 Tage: verhält sich nach dem Aufthauen genau so wie 1.
3. Einer Temperatur von  $-0,3^{\circ}$  C. —  $0^{\circ}$  C. durch 24 Stunden, dann 24 Stunden in Zimmertemperatur: Trübung, die in den folgenden Tagen rasch zunimmt.
4. Eine Temperatur von  $-0,3^{\circ}$  C. —  $0^{\circ}$  C. durch 6 Tage: verhält sich in Zimmertemperatur gebracht, genau so wie 3.
5. Einer Temperatur von  $+18^{\circ}$  C. durch 24 Stunden: schwache Trübung, die in den folgenden Tagen bei derselben Temperatur langsam zunimmt.
6. Einer Temperatur von  $+30^{\circ}$  C. —  $33^{\circ}$  C. durch 24 Stunden: intensive Trübung, welche dann bei Zimmertemperatur langsam zunimmt.
7. Einer Temperatur von  $+30^{\circ}$  C. —  $33^{\circ}$  C. durch 4 Tage: sehr intensive Trübung.

8. Einer Temperatur von  $+ 40^{\circ}$  C. —  $45^{\circ}$  C. durch 24 Stunden : schwache Trübung; dann mehrere Tage bei  $+ 30^{\circ}$  C. —  $33^{\circ}$  C. belassen : äusserst rasche Zunahme derselben.
9. Einer Temperatur von  $40^{\circ}$  C. —  $45^{\circ}$  C. durch 4 Tage : schwache Trübung, dann bei  $30 - 33^{\circ}$  C. rasche Zunahme derselben.
10. Einer Temperatur von  $50^{\circ}$  C. durch 1 Stunde : bei  $18^{\circ}$  C. stehen gelassen, nach 48 Stunden Trübung.
11. Einer Temperatur von  $60^{\circ}$  C. durch 1 Stunde : bei  $18^{\circ}$  C. stehen gelassen, nach 48 Stunden Trübung, dieselbe schwächer als in 10; erst nach 8 tägigen Stehen bei  $18^{\circ}$  C. sind 10. und 11. gleich intensiv trüb.
12. Einer Temperatur von  $70^{\circ}$  C. durch 1 Stunde : bleibt steril.
13. » » »  $80^{\circ}$  C. » 1 » » »
14. » » »  $90^{\circ}$  C. » 1 » » »
15. » » »  $100^{\circ}$  C. » 1 » » »

Diese Versuche wurden mehrmals wiederholt und ergaben stets das oben mitgetheilte Resultat.

Alle Controlversuche blieben steril.

Wir können daraus folgende Schlüsse für das Verhältniss des Harnstoffpilzes zur Temperatur ziehen:

1. Das Temperaturoptimum desselben liegt bei  $30^{\circ}$  C. —  $33^{\circ}$  C.
2. Bei Temperaturen unter  $0^{\circ}$  C. entwickelt sich der Pilz nicht, doch verliert er selbst bei einer mehrtägigen Einwirkung einer Temperatur von  $15^{\circ}$  C. seine Entwicklungsfähigkeit nicht.
3. Temperaturen über  $40^{\circ}$  C. verzögern die Entwicklung umsomehr, je höher die Temperatur steigt. Temperaturen über  $60^{\circ}$  C. heben die Entwicklungsfähigkeit völlig auf.

### Ueber die anorganischen Nährsalze des Harnstoffpilzes.

Wie schon oben erwähnt wurde in einer ersten Reihe von Versuchen der einem alkalisch reagirenden Harn entnommene Pilz in einer Nährlösung gezüchtet, welche im Liter enthielt:  $\frac{1}{4}$  gr. salpetersauern Kalk,  $\frac{1}{16}$  gr. salpetersaures Kali,  $\frac{1}{16}$  gr. schwefelsaure Magnesia,  $\frac{1}{16}$  gr. saures phosphorsaures Kali, 5 gr. Seignette-Salz und 5 gr. Harnstoff.

Dass der Harnstoffpilz der anorganischen Salze zu seiner Entwicklung benöthigt, war bereits nach den Angaben von Van Tieghem l. c. sehr wahrscheinlich.

Auch die analogen Arbeiten Pasteur's<sup>1)</sup> über die Bierhefe und A. Schultze's<sup>2)</sup> über die Spaltpilze des Weinkahms, in welchen beide Forscher zeigten, dass diese Pilze der anorganischen Salze zu ihrer Entwicklung bedürfen, wiesen darauf hin, dass sich auch der Harnstoffpilz ähnlich verhalten dürfte.

Es wurden, um diese Frage zu entscheiden, Spuren des Pilzes auf Flüssigkeiten

1) Die bloß  $\frac{1}{2}\%$  Harnstoff,

2) Die bloß  $\frac{1}{2}\%$  Seignettesalz,

3) Die Harnstoff und Seignettesalz zu je  $\frac{1}{2}\%$  enthielten, in gewöhnlicher Weise geimpft.

1, 2, 3 sind, nachdem sie 14 Tage einer Temperatur von  $30^{\circ}$  C. ausgesetzt worden waren, nur minimal trüb,<sup>3)</sup> während eine am selben Tage aus derselben Pilzcultur inficirte nebst Harnstoff und Seignettesalz anorganische Salze enthaltende Flüssigkeit die schon früher beschriebenen Veränderungen in ausgesprochenster Weise zeigte.

Die Wiederholung dieser Versuche gab stets das gleiche Resultat.

Der Harnstoffpilz bedarf also gleich der Bierhefe und dem Weinkahm zu seiner Entwicklung anorganischer Salze.

### Welcher anorganischer Salze bedarf der Harnstoffpilz?

Um diese Frage zu beantworten bereitete ich mir Nährlösungen die ausser Harnstoff und Seignettesalz bloß eines der 4 oben genannten Salze und zwar je  $\frac{1}{4}$  gr. im Liter enthielten und inficirte diese Flüssigkeiten dann in der gewöhnlichen Weise mit Pilzkeimen.

<sup>1)</sup> Pasteur: *Annal. de Chim. et Phys.* [3] T. 58, p. 388.

<sup>2)</sup> Mayer: *Gährungschemie*, S. 214.

<sup>3)</sup> Die minimale Trübung rührt wohl daher, dass mit den Pilzkeimen auch eine Spur anorganischer Salze in die Culturflüssigkeit gebracht wurde.

Es traten bei diesen Versuchsreihen nur minimale Trübungen der Culturflüssigkeiten nach Verlauf von 3—4 Tagen ein, die noch am stärksten ausgesprochen waren bei Anwendung des sauren phosphorsauren Kalis.

Demnach war weder salpetersaurer Kalk, noch salpetersaures Kali, noch schwefelsaure Magnesia, noch phosphorsaures Kali für sich allein im Stande, dem Pilz die nöthigen Aschebestandtheile zu liefern.

Es wurden nun in einer weiteren Versuchsreihe je zwei der obengenannten Salze combinirt als Nährlösung verwendet. Dabei fand sich, dass die Entwicklung ebenso schnell und intensiv vor sich ging wie in der ursprünglichen aus 4 Salzen zusammengesetzten Nährflüssigkeit, bei Verwendung des sauren phosphorsauren Kalis und der schwefelsauren Magnesia zusammen und zwar, wie entsprechende Versuche ergaben, am promptesten in Lösungen, welche  $\frac{1}{8}$  gr. saures phosphorsaures Kali und  $\frac{1}{16}$  gr. schwefelsaure Magnesia im Liter enthielten. Eine Vermehrung dieser beiden anorganischen Salze bis auf das zehnfache ihres Gewichtes hatte einen weniger stürmischen Verlauf der Gährung zur Folge.

Ein ähnliches Verhalten zeigte sich auch bei der Vermehrung der Menge der beiden zur Züchtung verwendeten organischen Substanzen: des Harnstoffes und des Seignettesalzes, ein Umstand, auf welchen ich später noch zurückkomme.

Ich benützte deshalb, wie schon anfangs erwähnt, zu allen weiteren Culturen des Pilzes eine Flüssigkeit, die im Liter enthielt:  $\frac{1}{8}$  gr. saures phosphorsaures Kali,  $\frac{1}{16}$  gr. schwefelsaure Magnesia, 5 gr. Seignettesalz und 3 gr. Harnstoff.

Eine weitere Einschränkung der mineralischen Nährbestandtheile erwies sich, wie die nun folgenden Versuche ergeben werden, als unmöglich. Dieselben wurden in der Weise ausgeführt, dass Kalium, Magnesium, die Phosphorsäure und Schwefelsäure nach einander eliminirt wurden.

Der hier folgende Auszug aus den Versuchsprotocollen, dürfte die Ausführung der Versuche am besten zeigen:

### I. Ausschluss des Kaliums.

50 Cc. Nährlösung, die im Liter enthält  $\frac{1}{16}$  gr. schwefelsaure Magnesia,  $\frac{1}{2}$  gr. phosphorsaures Natron, 5 gr. Harnstoff, und 5 gr. weinsaures Natron werden in gewöhnlicher Weise geimpft.

Verlauf der Gärung: nach 72 Stunden minimale Trübung der Flüssigkeit, nach 13 Tagen geringe Zunahme derselben.

### II. Ausschluss des Magnesiums.

50 Cc. Nährlösung, die im Liter enthält  $\frac{1}{8}$  gr. saures phosphorsaures Kali,  $\frac{1}{16}$  gr. schwefelsaures Kali, 5 gr. Harnstoff, 5 gr. Seignettesalz, wird mit dem Harnstoffpilz inficirt.

Verlauf der Gärung: nach 72 Stunden ist die Flüssigkeit klar, nach 13 Tagen zeigt sie eine schwache Trübung.

### III. Ausschluss der Schwefelsäure.

50 Cc. Nährlösung, die im Liter gelöst enthält  $\frac{1}{8}$  gr. saures phosphorsaures Kali,  $\frac{1}{16}$  gr. Chlormagnesium, 5 gr. Harnstoff, 5 gr. Seignettesalz, wird unter den gewöhnlichen Cauteleu geimpft.

Verlauf der Gärung: nach 72 Stunden schwache Trübung der Flüssigkeit, nach 13 Tagen ist dieselbe etwas stärker.

### IV. Ausschluss der Phosphorsäure.

50 Cc. Nährlösung, die im Liter enthält  $\frac{1}{8}$  gr. schwefelsaures Kali,  $\frac{1}{16}$  gr. schwefelsaure Magnesia, 5 gr. Harnstoff und 5 gr. Seignettesalz, wird in gewöhnlicher Weise geimpft.

Verlauf der Gärung: die Flüssigkeit ist nach 14 Tagen vollständig klar.<sup>1)</sup>

Als am 14. Tage des Versuches die Intensität der Trübungen in I, II, III, IV verglichen wurde mit der Trübung, die in einem Kölbchen, welches meine Nährlösung enthielt und am selben Tage und aus derselben Pilzcultur geimpft worden war, sich entwickelt hatte, zeigte sich, dass dieselben minimal waren. Die relativ stärkste Trübung wies der kalifreie Versuch auf, bei Ausschluss der Schwefelsäure war die Trübung noch schwächer und am schwächsten bei Ausschluss der Magnesia. Die phosphorsäurefreie Cultur zeigte überhaupt gar keine Entwicklung.

Aus diesen Versuchsreihen ergibt sich, dass der Harnstoffpilz ohne bestimmte Aschenbestandtheile nicht leben kann und zwar bedarf er zu seiner Entwicklung des Kaliums, Magnesiums, der Phosphorsäure und der Schwefelsäure.

<sup>1)</sup> Diese Versuchsreihe wurde dreimal wiederholt und gab stets dasselbe Resultat.

## Ueber die organischen Substanzen, welche der Pilz zu seiner Entwicklung benöthigt.

Versuche den Pilz in Flüssigkeiten zu züchten, die ausser den beiden anorganischen Salzen entweder bloss Harnstoff oder bloss Seignettesalz enthielten, ergaben ein negatives Resultat.

### Versuchsprotocol.

I. 50 Cc. einer Nährlösung, die im Liter enthält  $\frac{1}{8}$  gr. saures phosphorsaures Kali,  $\frac{1}{16}$  gr. schwefelsaure Magnesia und 5 gr. Harnstoff werden in der gewöhnlichen Weise inficirt.

Bei 30° C. tritt erst nach 18 Stunden leichte Trübung ein, die in den folgenden Tagen nicht an Intensität zunimmt.

II. 50 Cc. einer Nährlösung, die im Liter enthält  $\frac{1}{8}$  gr. saures phosphorsaures Kali,  $\frac{1}{16}$  gr. schwefelsaure Magnesia, 5 gr. Seignettesalz, werden in der gewöhnlichen Weise inficirt.

Bei 30° C. erst nach 72 Stunden leichte Trübung, die in den folgenden Tagen nicht an Intensität zunimmt.

III. 50 Cc. meiner gewöhnlichen Nährlösung werden aus derselben Cultur und am selben Tage wie I. und II. geimpft.

Bei 30° C. nach 24 Stunden intensive Trübung, der weitere Verlauf der Gährung genau so wie bereits oben beschrieben.<sup>1)</sup>

Es wurden nun weitere Versuchsreihen ausgeführt, um die Einwirkung einer höheren Concentration dieser organischen Körper auf den Verlauf der Gährung zu studiren.

Es ergab sich, dass eine Vermehrung des Harnstoffes allein bis um das 10fache seines Gewichtes, desgleichen auch des Seignettesalzes allein den Eintritt der Gährung um 24 Stunden verzögert und dass der weitere Verlauf der Gährung unter diesen Verhältnissen nicht so lebhaft ist als bei Anwendung einer Lösung von 5 grm. Harnstoff und 5 grm. Seignettesalz im Liter.

Wurden jedoch beide organische Substanzen um das Zehnfache ihres Gewichtes vermehrt, so trat zwar erst nach 48 Stunden eine Gährung ein, doch verlief dieselbe rascher als in der gewöhnlichen Nährlösung und die erhaltene Trübung war bereits nach weiteren 24 Stunden intensiver als in der in gleicher Zeit inficirten gewöhnlichen Nährlösung.

<sup>1)</sup> Auch dieser Versuch wurde mehrmals wiederholt und ergab stets das gleiche Resultat.

Aus diesen Versuchen ergibt sich:

- 1) Der Harnstoffpilz braucht ausser anorganischen Substanzen zu seiner Entwicklung auch organischer Substanzen. Harnstoff und Seignettesalz sind tauglich zu diesem Zweck.
- 2) Eine Vermehrung bloss eines dieser genannten Körper um das 10 fache seines Gewichtes verzögert den Eintritt der Gährung und vermindert die Intensität derselben.
- 3) Eine Vermehrung dieser beiden Substanzen verzögert den Eintritt der Gährung um 24 Stunden, dieselbe tritt jedoch dann sehr intensiv ein.

In den folgenden Versuchsreihen suchte ich zu ermitteln, durch welche anderen organischen Verbindungen diese beiden dem Pilz zur Ernährung nöthigen Körper eventuell ersetzt werden können. Die Substanzen, welche ich in Verwendung brachte, waren 1) Fettkörper, 2) aromatische Verbindungen, 3) Kohlehydrate, 4) Pepton.

Stets wurde dabei mit einer doppelten Reihe von Controlversuchen gearbeitet.

- 1) Wurden 50 Cc. unserer Nährflüssigkeit in gewöhnlicher Weise mit Pilzkeimen inficirt;
- 2) 50 Cc. derselben Flüssigkeit mit ausgekochtem und auf Zimmertemperatur gebrachttem Wasser geimpft;
- 3) 50 Cc. unserer Nährlösung, die statt Harnstoff, Seignettesalz oder beider Körper  $\frac{1}{4}$  respective  $\frac{1}{2}$  grm. der zu dem Versuche verwendeten organischen Substanz enthielt, mit Pilzkeimen inficirt.

Ich war so in der Lage mich stets zu überzeugen, dass zufällige Infectionen durch die in der Luft enthaltenen Keime völlig ausgeschlossen waren.

Anderseits gab die in dem mit gewöhnlicher Nährlösung gefüllten Kölbchen ablaufende Gährung ein Vergleichsobjekt zu der Gährung, welche in dem mit anderen organischen Substanzen beschickten Culturapparat vor sich gieng.

Alle Versuche wurden bei 30° C. zu Ende geführt.

## I. Fettkörper.

### 1. Ameisensaure Salze.

- a) 50 Cc. meiner anorganischen Nährlösung werden  $\frac{1}{4}$  gr. ameisen-saures Natron zugesetzt und dann die Flüssigkeit geimpft. Dieselbe ist nach 14 Tagen vollkommen klar.
- b) 50 Cc. Nährlösung +  $\frac{1}{4}$  gr. ameisensaures Ammoniak werden mit Pilzen geimpft. Die Flüssigkeit ist nach 14 Tagen ganz klar.
- c) 50 Cc. Nährlösung +  $\frac{1}{4}$  gr. ameisensaures Natron +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff werden mit Pilzkeimen inficirt.

Nach 48 Stunden schwache Trübung. Nach 14 Tagen ist die Entwicklung der Pilze bedeutend schwächer als in dem in gleicher Zeit inficirten, die gewöhnliche Nährlösung enthaltenden Cultur-apparat.

- d) 50 Cc. anorganischer Nährlösung +  $\frac{1}{4}$  gr. ameisensaures Ammoniak +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff.

Die Flüssigkeit ist nach 14 Tagen vollkommen klar.

Eine Wiederholung dieser vier Versuche mit  $\frac{1}{2}$  grm. ameisensaurem Salz ergibt dasselbe Resultat.

Diese Versuche zeigen, dass der Pilz, wenn man ihm Harnstoff und ameisensaures Natron reicht, sich entwickeln kann, die Entwicklung aber schlechter von Statten geht als bei Anwesenheit von Harnstoff und Seignettesalz. In ameisen-saurem Ammoniak jedoch ist der Pilz auch bei Anwesenheit von Harnstoff nicht im Stande sich zu entwickeln.

### 2. Essigsäure Salze.

- a) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{4}$  gr. essigsäures Natron sind 14 Tage nach der Impfung vollständig steril.
- b) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{4}$  gr. essigsäures Ammoniak sind 14 Tage nach der Impfung vollständig steril.
- c) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{4}$  gr. essigsäures Ammoniak +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff: 14 Tage nach der Impfung ist die Flüssigkeit vollkommen klar.
- d) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{4}$  gr. essigsäures Natron +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff werden mit Pilzen inficirt: 24 Stunden später hat sich eine intensive Trübung der Flüssigkeit eingestellt. Der weitere Verlauf der Gährung ist genau derselbe wie in dem gleichzeitig geimpften Controlversuch.

Eine Wiederholung dieser Versuche mit  $\frac{1}{2}$  gr. der essigsäuren Salze ergibt das gleiche Resultat.

Essigsäures Natron und Harnstoff sind ein gutes Nähr-

material für unseren Pilz, während er in essigsaurem Ammoniak auch bei Anwesenheit von Harnstoff nicht leben kann.

### 3. Buttersaure Salze.<sup>1)</sup>

- a) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. gährungs-buttersaures Natron: 14 Tage nach der Impfung vollständig steril.
- b) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. buttersaures Ammoniak: 14 Tage nach der Impfung vollständig steril.
- c) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. buttersaures Natron +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff sind 24 Stunden nach der Impfung etwas trüb, nach Verlauf von 14 Tagen ist die Trübung bedeutend schwächer als in dem gleichzeitig geimpften Controlversuch.
- d) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. buttersaures Ammoniak +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff sind 14 Tage nach der Impfung völlig klar.

Diese Versuche zeigen, dass die buttersauren Salze sich ganz analog zu dem Pilze verhalten, wie die ameisensauren Salze, sie sind für den Pilz ein schlechtes Nährmaterial und er kann vom Ammoniaksalz auch bei Anwesenheit von Harnstoff nicht leben, eine Eigenschaft, welche die Ammoniaksalze dieser beiden Säuren mit dem essigsauren Ammoniak theilen, während essigsaures Natron im Gegensatz zum ameisensauren und buttersauren Natron bei Anwesenheit von Harnstoff ein sehr gutes Nährmaterial darstellt.

### 4. Oxalsaure Salze.

Genau in derselben Weise wie bisher wurden die Versuche mit oxalsauren Salzen durchgeführt.

- a) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. oxalsaures Kali.  
Die inficirte Flüssigkeit blieb steril.
- b) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. oxalsaures Ammoniak.  
Die inficirte Flüssigkeit blieb steril.
- c) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. oxalsaures Kali +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff.  
Die inficirte Flüssigkeit blieb steril.
- d) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. oxalsaures Ammoniak +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff.  
Die inficirte Flüssigkeit blieb steril.

Versuche mit oxalsaurem Natron ergaben das gleiche Resultat. In den zu gleicher Zeit geimpften Controlversuchen lief die Gährung in der bekannten Weise ab.

<sup>1)</sup> Von einem aus käuflicher Buttersäure dargestellten Präparat wurde in diesen Versuchen nur die bei 162° C. übergehende Portion verwendet.

Es zeigen diese Versuche, dass die oxalsauren Salze völlig ungeeignet sind, unseren Pilz zu ernähren.

### 5) Bernsteinsäure Salze.

- a) 50 Cc. anorganische Nährlösung + 0,1 gr. bernsteinsaures Natron sind 14 Tage nach der Impfung vollständig klar.
- b) 50 Cc. anorganische Nährlösung + 0,1 gr. bernsteinsaures Ammoniak zeigen nach 24 Stunden eine schwache Trübung, nach Verlauf von 14 Tagen ist dieselbe fast ebenso intensiv wie in dem geimpften Controlversuche.
- c) 50 Cc. anorganische Nährlösung + 0,1 gr. bernsteinsaures Natron +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff sind 24 Stunden nach der Impfung ebenso trüb wie der geimpfte Controlversuch.
- d) 50 Cc. anorganische Nährlösung + 0,1 gr. bernsteinsaures Ammoniak +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff: Verlauf der Gärung wie in c).

Der Pilz gedeiht in bernsteinsaurem Natron bei Anwesenheit von Harnstoff gut, desgleichen auch in bernsteinsaurem Ammoniak bei und ohne Anwesenheit von Harnstoff; nur verläuft beim Fehlen des Harnstoffes die Gärung träger.

### 6. Milchsäure Salze.

- a) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. gährungs-milchsäures Natron sind nach 14 Tagen völlig klar.
- b) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. milchsäures Ammoniak sind 24 Stunden nach der Impfung schwach trüb, nach 14 Tagen ist die Trübung ebenso intensiv wie in dem gleichzeitig geimpften Controlversuch.
- c) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. milchsäures Natron +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff sind 24 Stunden nach der Impfung intensiv trüb, Ablauf der Gärung wie im geimpften Controlversuch.
- d) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. milchsäures Ammoniak +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff: Ablauf der Gärung wie in c).

Das Natronsalz der Milchsäure ist bei Anwesenheit von Harnstoff im Stande den Pilz zu ernähren, desgleichen auch das Ammoniaksalz. Auch bei Abwesenheit von Harnstoff kann der Pilz im Ammoniaksalz vegetieren; die Entwicklung desselben geht etwas träger vor sich als bei Anwesenheit von Harnstoff.

Das genau gleiche Verhalten gegen den Pilz zeigten auch:

7. Die äpfelsäuren Salze.

8. Die weinsäuren Salze.

9. Die citronensäuren Salze.

Die Versuche wurden mit den gleichen Mengen der Natron- und Ammoniaksalze der betreffenden Säuren wie bei der Milchsäure ausgeführt, so dass ich die detaillirte Mittheilung der Versuchsprotokolle unterlassen kann.

### 10. Glycerin.

Wurde unser Pilz bei Anwesenheit von Harnstoff und der entsprechenden anorganischen Salze mit Glycerin ( $\frac{1}{2}$  grm. auf 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{4}$  grm. Harnstoff) zusammengebracht, so trat erst nach 72 Stunden eine Trübung der Flüssigkeit auf, die nach Verlauf von 2--3 Tagen so stark geworden war, wie in der in gleicher Zeit inficirten Culturflüssigkeit, welche meine Nährlösung enthielt.

### 11. Glycocoll.

- a) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{4}$  gr. Glycocoll sind 24 Stunden nach der Impfung ebenso intensiv getrübt wie die geimpfte Controlflüssigkeit.
- b) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{4}$  gr. Glycocoll +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff mit Pilzkeimen inficirt verhalten sich ebenso wie a).

Das Glycocoll ist im Stande dem Pilz die ihm nöthigen organischen Nährstoffe zu liefern auch ohne Hinzufügung von Harnstoff.

### 12. Leucin.

- a) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. Leucin sind 24 Stunden nach der Impfung ebenso intensiv getrübt wie die geimpfte Controlflüssigkeit.
- b) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. Leucin +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff zeigt genau dasselbe Verhalten nach der Impfung wie a).

Leucin verhält sich demnach zu diesem Pilz genau so wie Glycocoll.

### 13 Asparagin.

- a) 50 Cc. anorganische Nährlösung + 0,4 gr. Asparagin zeigen 24 Stunden nach der Impfung eine ebenso intensive Trübung wie die geimpfte Controlflüssigkeit.
- b) 50 Cc. anorganische Nährlösung + 0,4 gr. Asparagin +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff verhalten sich nach der Impfung genau so wie a).

Das Asparagin schliesst sich in seinem Verhalten gegen den Harnstoffpilz ganz dem Glycocoll und Leucin an.

#### 14. Asparaginsäure Salze.

- a) 50 Cc. anorganische Nährlösung + 0,1 gr. asparaginsäures Natron sind 72 Stunden nach der Impfung schwach getrübt, die Intensität der Trübung hat nach Verlauf von 8 Tagen nur wenig zugenommen.
- b) 50 Cc. anorganische Nährlösung + 0,1 gr. asparaginsäures Ammoniak sind 48 Stunden nach der Impfung stark getrübt.
- c) 50 Cc. anorganische Nährlösung + 0,1 gr. asparaginsäures Natron +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff zeigen nach der Impfung denselben Verlauf der Gärung, wie der geimpfte Controlversuch.
- d) 50 Cc. anorganische Nährlösung + 0,1 gr. asparaginsäures Ammoniak +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff zeigen denselben Verlauf der Gärung wie c).

Asparaginsäures Natron für sich kann den Pilz ernähren, er gedeiht jedoch nicht sonderlich gut; besser vermag er in asparaginsäurem Ammoniak zu leben, am besten jedoch geht seine Entwicklung in diesen Salzen vor sich, wenn man Harnstoff hinzufügt.

#### 15. Acetamid.

- a) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. Acetamid bleiben nach der Impfung vollständig steril, während in dem zu gleicher Zeit geimpften Controlversuch die Gärung in bekannter Weise abläuft.
- b) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. Acetamid +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff bleiben nach der Impfung steril.
- c) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. Acetamid +  $\frac{1}{4}$  gr. Seignettesalz bleiben nach der Impfung gleichfalls steril.

Das Acetamid erwies sich nach diesen Versuchen völlig untauglich den Pilz zu ernähren.

#### 16. Oxaminsäure Salze.

- a) 50 Cc. anorganische Nährlösung + 0,16 gr. oxaminsäures Natron sind 14 Tage nach der Impfung vollständig klar.
- b) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. oxaminsäures Ammoniak sind 14 Tage nach der Impfung minimal getrübt.
- c) 50 Cc. anorganische Nährlösung + 0,16 gr. oxaminsäures Natron +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff sind 14 Tage nach der Impfung schwach getrübt.
- d) 50 Cc. anorganische Nährlösung + 0,16 gr. oxaminsäures Natron +  $\frac{1}{4}$  gr. Seignettesalz sind 24 Stunden nach der Impfung schwach, 14 Tage später ebenso intensiv getrübt wie die in gleicher Zeit inficirte, gewöhnliche Nährlösung enthaltende Culturflüssigkeit.

Dieses Verhalten der oxaminsäuren Salze zeigt, dass sie im Allgemeinen ein schlechtes Nährmaterial für den Pilz abgeben; doch wuchert der Pilz bei Anwesenheit eines

zweiten organischen Salzes auch unter Ausschluss des Harnstoffs üppig.

### 17. Kreatin.

- a) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{4}$  gr. Kreatin zeigen 48 Stunden nach der Impfung eine schwache Trübung, die im Verlauf der nächsten Tage noch an Intensität zunimmt.
- b) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{4}$  gr. Kreatin +  $\frac{1}{4}$  gr. Seignettesalz zeigen 24 Stunden nach der Impfung eine ebenso intensive Trübung wie der gleichzeitig geimpfte Controlversuch.
- c) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{4}$  gr. Kreatin +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff verhalten sich nach der Impfung genau so wie a).

Das Kreatin kann also für sich allein die dem Pilz nöthigen organischen Substanzen liefern, noch besser aber geht die Entwicklung von statten, wenn noch Seignettesalz der Culturflüssigkeit hinzugefügt wird.

## II. Aromatische Verbindungen.

### 1. Benzoesaure Salze.

- a) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{9}$  gr. benzoesaures Natron sind 14 Tage nach der Impfung vollkommen klar.
- b) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. benzoesaures Ammoniak sind 14 Tage nach der Impfung schwach getrübt.
- c) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. benzoesaures Natron +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff sind 24 Stunden nach der Impfung intensiv getrübt, weiterer Verlauf der Gärung so, wie in dem in gleicher Zeit geimpften Controlversuch.
- d) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. benzoesaures Natron +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff, geimpft, Verlauf der Gärung wie c).

Benzoesaures Natron und benzoesaures Ammoniak nähren bei Anwesenheit von Harnstoff den Pilz vortrefflich; benzoesaures Ammoniak allein ist hierzu nicht so gut geeignet.

### 2. Salicylsaure Salze.

- a) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. salicylsaures Natron sind 14 Tage nach der Impfung vollkommen klar.
- b) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. salicylsaures Ammoniak verhalten sich gleich wie a).
- c) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. salicylsaures Natron +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff zeigen 14 Tage nach der Impfung eine minimale Trübung.
- d) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. salicylsaures Ammoniak +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff verhalten sich genau so wie c).

Diese Versuche zeigen, dass salicylsaure Salze untauglich sind den Pilz zu nähren, obgleich sie nicht absolute Gifte für ihn sind, wie Versuch c) und d) lehrt.

### 3. Hippursäure Salze.

- a) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. hippursaures Natron zeigen erst 72 Stunden nach der Impfung eine Trübung; dieselbe nimmt rasch zu, ist bereits am 4. Tage so intensiv wie in dem zugleich geimpften Controlversuch.
- b) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. hippursaures Natron +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff; die Gärung verläuft so, wie in dem geimpften Controlversuch.
- c) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. hippursaures Natron +  $\frac{1}{4}$  gr. Seignettesalz zeigen 24 Stunden nach der Impfung eine minimale, 48 Stunden nach derselben eine intensive Trübung; dieselbe ist bereits am 5. Tage nach der Infection stärker als in dem zugleich geimpften Controlversuch.

Es zeigt dieses Verhalten, dass hippursäure Salze auch ohne Anwesenheit von Harnstoff dem Pilze ein taugliches Nährmaterial liefern bei Anwesenheit von Harnstoff jedoch geht die Entwicklung rascher vor sich; desgleichen beschleunigt bei Fehlen des Harnstoffes auch ein Zusatz von Seignettesalz den Gärungsprozess.

## III. Kohlehydrate.

### 1. Traubenzucker.

- a) 50 Cc. anorganische Nährlösung + 0,2 gr. chemisch reiner Traubenzucker bleiben nach der Impfung völlig steril.
- b) 50 Cc. anorganische Nährlösung + 0,2 gr. Traubenzucker +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff zeigen 24 Stunden nach der Impfung eine intensive Trübung; weiterer Verlauf der Gärung so, wie in dem zugleich geimpften Controlversuch.

### 2. Galaktose.

50 Cc. anorganische Nährlösung + 0,2 gr. Galaktose +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff sind 24 Stunden nach der Impfung schwach trüb, auch 14 Tage später ist die Trübung gering.

### 3. Invertzucker.

50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. Invertzucker +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff; die Gärung verläuft ebenso wie bei Anwendung von Harnstoff und Traubenzucker.

#### 4. Rohrzucker.

50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. Rohrzucker +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff sind 24 Stunden nach der Impfung nur schwach trüb, die Trübung nimmt im Verlauf der nächsten Tage bloß wenig zu.

#### 5. Milchzucker.

50 Cc. anorganische Nährlösung + 0,2 gr. Milchzucker +  $\frac{1}{2}$  gr. Harnstoff; Verlauf der Gärung wie 4.

Daraus ergibt sich, dass in Traubenzucker und Invertzucker bei Anwesenheit von Harnstoff die Entwicklung des Pilzes vorzüglich von statten gieng; als weniger geeignet für das Gedeihen des Pilzes erwiesen sich die Galaktose, der Rohrzucker und der Milchzucker.

### IV. Pepton.

- a) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. reines Pepton zeigen nach 24 Stunden eine schwache, nach 48 Stunden eine intensive Trübung der ganzen Flüssigkeit.
- b) 50 Cc. anorganische Nährlösung +  $\frac{1}{2}$  gr. Pepton +  $\frac{1}{4}$  gr. Harnstoff zeigen 24 Stunden nach der Impfung eine intensive Trübung; der weitere Verlauf der Gärung so, wie in dem gleichzeitig geimpften Controlversuch.

Das Pepton kann also auch ohne einen Zusatz von Harnstoff den Pilz nähren, doch geht die Entwicklung bei Anwesenheit von Harnstoff prompter vor sich.

Die soeben mitgetheilten Versuche zeigen, dass der Harnstoffpilz zu seiner Entwicklung organischer Verbindungen nicht entbehren kann. Jedoch nicht jede organische Verbindung liefert ihm die zu seiner Vegetation erforderlichen Substanzen, so z. B. ergibt sich aus den Versuchen, dass die Natronsalze der Fettsäuren nicht im Stande sind, ihn zu ernähren; es fehlt der Stickstoff; fügt man aber Harnstoff als Stickstoffquelle hinzu, so erfolgt eine prompte Pilzentwicklung.

In Harnstoff und der anorganischen Nährsalzlösung, desgleichen in oxaminsaurem Natron und der anorganischen Salzlösung tritt keine Pilzentwicklung ein, fügt man aber Seignettesalz hinzu, so tritt nach kurzer Zeit eine üppige Pilzvegetation ein. Das Seignettesalz liefert dem Pilze

den Kohlenstoff, der Harnstoff den Stickstoff, den er zu seinem Leben braucht.

Daraus schon ergibt sich, dass nur dann allen zu seiner Entwicklung nöthigen Bedingungen Rechnung getragen ist, wenn man unserem Pilze ausser den beiden anorganischen Substanzen noch eine Kohlenstoff- und eine Stickstoffquelle gewährt.

Man kann demnach die hier in Verwendung gebrachten organischen Verbindungen in 3 Gruppen theilen:

- A. Solche, die ihm den Bedarf an Stickstoff,
- B. Solche, die ihm den Bedarf an Kohlenstoff, und
- C. Solche, die ihm den Bedarf an beiden liefern.

Zu A. gehören nach meinen Versuchen:

- 1) Der Harnstoff,
- 2) Oxaminsaures Natron.

Denn in Lösungen dieser beiden Körper tritt nur dann eine kräftige und prompte Pilzentwicklung ein, wenn Seignettesalz hinzugefügt wird, welches dem Pilze den ihm nöthigen Kohlenstoff liefert.

Zu B., d. h. zu jenen Körpern, welche dem Pilz den Kohlenstoff liefern können, gehören aus der Reihe der Fettkörper:

- 1) Ameisensaures Natron,
- 2) Essigsaures Natron,
- 3) Buttersaures Natron,
- 4) Bernsteinsaures Natron,
- 5) Milchsäures Natron,
- 6) Aepfelsaures Natron,
- 7) Weinsaures Natron,
- 8) Citronensaures Natron,
- 9) Glycerin.

Aus den aromatischen Verbindungen:

- 10) Benzoesaures Natron.

Aus der Reihe der Kohlehydrate:

- 11) Traubenzucker,
- 12) Galaktose.

- 13) Invertzucker,
- 14) Rohrzucker,
- 15) Milchzucker.

In die 3. Gruppe, als Verbindungen, welche dem Harnstoffpilz zugleich den Kohlenstoff und den Stickstoff liefern können, gehören aus der Reihe der Fettkörper:

- 1) Bernsteinsaures Ammoniak,
- 2) Milchsäures Ammoniak,
- 3) Äpfelsäures «
- 4) Weinsäures «
- 5) Citronensäures Ammoniak,
- 6) Glycocoll,
- 7) Leucin,
- 8) Asparagin,
- 9) Asparaginsäure Salze.
- 10) Kreatin,

aus der Reihe der aromatischen Verbindungen:

- 11) Benzoesäures Ammoniak,
- 12) Hippursäure Salze, endlich
- 13) Pepton.

Es erübrigt nun noch, nach der Aufzählung derjenigen organischen Körper, welche als tauglich erkannt wurden den Pilz zu ernähren, jener Körper zu gedenken, welche sich entweder in einer oder in beiden Richtungen als unbrauchbar erwiesen.

Unbrauchbar als Stickstoff- und als Kohlenstoffquelle erwiesen sich von den in Verwendung gezogenen Körpern aus der Reihe der Fettkörper:

- 1) Ameisensäures Ammoniak,
- 2) Buttersäures Ammoniak,
- 3) Essigsäures Ammoniak,
- 4) Oxalsäures Ammoniak,
- 5) Acetamid;

von den aromatischen Verbindungen:

- 6) Salicylsäures Ammoniak.

Es scheint mir ein nicht unwichtiges Ergebniss dieser

Studien, dass die Ammoniaksalze der drei kohlenstoffärmsten zu diesen Versuchen in Anwendung gebrachten Fettsäuren sich

- 1) als absolut untauglich erwiesen, dem Pilz Kohlenstoff und Ammoniak zu liefern, im Gegensatz zu den höheren Fettsäuren, in deren Ammoniaksalzen der Pilz auch ohne Anwesenheit von Harnstoff prosperirte;
- 2) dass sie nicht einmal im Stande sind, ihm den nöthigen Kohlenstoff zu liefern, denn meine Versuche ergeben, dass auch bei Zusatz eines vorzüglichen stickstoffhaltigen Nährstoffs (des Harnstoffs) jede Entwicklung des Pilzes ausbleibt.

Erwähnen will ich hier, dass dieses Verhalten beim ameisensauren und buttersauren Ammoniak wohl weniger auffallend ist, da wir sehen, dass auch die Natronsalze dieser beiden Säuren kein sonderlich günstiges Nährmaterial für den Pilz sind; sehr merkwürdig ist dagegen das Verhalten des essigsauren Ammoniaks, da das essigsaure Natron bei Anwesenheit des Harnstoffs eine vorzügliche Kohlenstoffquelle für den Pilz darstellt.

Etwas verständlicher wird uns dieses Verhalten, wenn wir es vergleichen mit der Einwirkung der oxalsauren Salze auf unseren Pilz; alle oxalsauren Salze sind, wie die Versuche lehren, auch bei Anwesenheit von Harnstoff nicht im Stande den Pilz zu ernähren, oxalsaures Ammoniak mit und ohne Harnstoff lässt keine Pilzvegetation aufkommen. Es kann also weder den Kohlenstoffbedarf noch den Stickstoffbedarf des Pilzes decken. Vielleicht liegt in der relativ nahen Verwandtschaft der Oxalsäure zur Kohlensäure der Grund dieses Verhaltens.

Ein besonders merkwürdiges Verhalten zeigte auch Acetamid, ein Körper, von welchem nach seiner ammoniakartigen Constitution zu erwarten stand, dass er vielleicht eine passende Stickstoffquelle für den Pilz abgeben dürfte.

Aber weder Acetamid für sich, noch Acetamid und Harnstoff, noch Acetamid und Seignettesalz liess eine Pilzvegetation aufkommen, ein Verhalten, welches lehrt, dass

Acetamid sowohl als Stickstoff- wie als Kohlenstoffquelle gänzlich unbrauchbar ist.

Dass salicylsaures Ammoniak keine passende Kohlenstoff- und Stickstoffquelle für unseren Pilz abgibt, kann uns bei den bekannten antiseptischen Wirkungen dieser Säure nicht Wunder nehmen.

Unbrauchbar als Kohlenstoffquelle zu dienen, erwies sich oxaminsaures Natron; denn in einer Lösung von oxaminsaurem Natron und Harnstoff bleibt jede Pilzentwicklung aus, setzt man zu einer Lösung von oxaminsaurem Natron jedoch Seignettesalz, so tritt eine prompte Entwicklung des Pilzes ein, ein Versuch, der in bestimmter Weise das oben Gesagte bestätigt.

Zum Schluss möchte ich noch auf das etwas eigenthümliche Verhalten hippursaurer Salze zu diesem Pilz aufmerksam machen. Die Versuche mit diesem Körper zeigen, dass das hippursaure Natron dem Pilze eine gut convenirende Stickstoff- und Kohlenstoffquelle ist, dass es jedoch für den Pilz mit einigen Schwierigkeiten verbunden ist, seinen Stickstoffbedarf dem hippursaurer Natron zu entnehmen. Es geht dieser Process jedoch leichter vor sich, wenn noch eine andere kohlenstoffhaltige Substanz zugegen ist, dieser Versuch aber zeigt uns, dass der Pilz während seiner ersten Entwicklungsstadien vorwiegend des Kohlenstoffes bedarf.

### Ueber die Beziehungen des Sauerstoffs zum Harnstoffpilz.

#### **Methode.**

Einen Meter lange, ungefähr  $1\frac{1}{2}$  Centimeter im Durchmesser habende Glasröhren wurden an ihren unteren Enden zugeschmolzen, an ihren oberen Enden ausgezogen, mit meiner Culturflüssigkeit gefüllt und dieselbe in den Glasröhren gekocht bis der Dampf aus dem oberen Ende der Röhren hervorströmte. Nun wurden die Röhren mit einem Wattepfropf verschlossen, die Flüssigkeit aber zur Zimmertemperatur abkühlen gelassen und dann, nachdem der Wattepfropf auf

einen Moment entfernt worden war, die Culturflüssigkeit mittelst haardünnere Röhren mit Pilzkeimen inficirt. Dann wurde neuerdings ein Wattepfropf  $\frac{1}{4}$  Meter tief in das Glasrohr eingesenkt, der oberhalb des Pfropfs befindliche Theil der Röhre winkelig genickt und nach dem Abkühlen dieselbe mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden, bis alle Luft ausgepumpt war; während nun die Pumpe sich noch in Thätigkeit befand, wurde der zwischen Pumpe und Wattepfropf befindliche Theil der Röhre zugeschmolzen.

Die Versuche wurden 3mal wiederholt, in der Weise, dass jedesmal aus je vier mit Pilzkeimen inficirten Culturflüssigkeiten, welche sich in den oben beschriebenen Röhren befanden, die Luft ausgepumpt, aus je zwei nicht ausgepumpt wurde.

Die luftfreien Culturflüssigkeiten blieben steril, die lufthaltigen gährten in der gewöhnlichen Weise.

Alle Culturflüssigkeiten waren einer Temperatur von  $30^{\circ}$  C. ausgesetzt.

Resultat der Versuche: Der Harnstoffpilz bedarf, um in einer Lösung von saurem phosphorsauren Kali, schwefelsaurer Magnesia, Harnstoff und Seignettesalz sich entwickeln und fortpflanzen zu können, des Sauerstoffs.]

### Morphologie und Entwicklung des Harnstoffpilzes.

Ich gebe im Nachfolgenden die Resultate meiner Untersuchungen über die Entwicklung des Harnstoffpilzes und komme dann erst auf die in der Litteratur enthaltenen Angaben zurück.

Die Versuche wurden in der Art angestellt, dass eine Anzahl (10–12) Kölbchen, die mit meiner gewöhnlichen Nährlösung gefüllt waren, von derselben Pilzgeneration inficirt und einer Temperatur von  $30^{\circ}$  C. verschieden lange Zeit ausgesetzt wurden.

Ein Kölbchen wurde nach 24, das zweite nach 48, das dritte nach 72 Stunden u. s. w. geöffnet und der Inhalt nach

der Methode von Koch<sup>1)</sup> microscopisch untersucht. Dabei wurden zu den Präparaten ein Tropfen der Flüssigkeit von der Oberfläche, ein zweiter aus der Mitte, ein dritter vom Boden entnommen, stets zeigten die drei Präparate dieselben Bilder.

Es zeigte sich dabei, dass der Harnstoffpilz in verschiedenen Stadien seiner Entwicklung verschiedene Formen aufweist.

In den ersten 24 Stunden fanden sich ausschliesslich Stäbchen, welche eine Länge von im Durchschnitt 2—3 Mikron und eine Breite von  $\frac{1}{2}$  Mikre hatte. Ihre Contouren erwiesen sich bei genauer Betrachtung nicht als gradlinig, sondern die Stäbchen waren mit 1—2 seichten Einkerbungen versehen, so dass es bisweilen den Anschein hatte, dass sie aus 2—3 kurzen Gliedern bestehen (Figur I; Stäbchenform).

Schon nach 48 Stunden erschienen diese Einkerbungen deutlicher, die Stäbchen selbst etwas kürzer, so dass sie wie Figur II zeigt, zum grössten Theile in rosenkranzförmig angeordnete Kügelchen aufgelöst erschienen, deren Zahl meist 3, selten 2 oder 4 betrug (Rosenkranzform).

Nach Verlauf von 14 Tagen war von den Stäbchen nichts mehr zu sehen und es hatten sich aus ihnen theils grössere, theils kleinere, ziemlich regelmässig angeordnete Mikrokokkenballen gebildet, die durch eine etwas schwächer lichtbrechende Zwischensubstanz mit einander verbunden waren (Zoogloeaform). Wird von einer Pilzflüssigkeit, die ausschliesslich diese Formen zeigt, eine Spur auf eine frische Nährlösung übertragen, so kommt es neuerdings zur Entwicklung der Stäbchenform des Harnstoffpilzes.

Die Versuche wurden in gleicher Anzahl mit äpfelsaurem und weinsaurem Ammoniak wiederholt. Dabei zeigte sich, dass der Pilz genau dieselben morphologischen Veränderungen eingehe, nur dauerte es circa 8 Tage länger bis alle Stäbchen sich in Mikrokokkenballen umgewandelt hatten.

<sup>1)</sup> Cohn: Beiträge zur Biologie der Pflanzen, II. Band, S. 399.  
— Koch: Untersuchung über Bacterien. Verfahren zur Untersuchung, zum Conserviren und Photographiren der Bacterien.

Alle diese Versuche wurden mehrmals wiederholt und ergaben stets das oben mitgetheilte Resultat.

Es scheint mir ein nicht unwichtiges Ergebniss dieser Versuche, dass die morphologischen Verhältnisse des Pilzes während seiner Entwicklung eine wesentliche Aenderung erfahren. Dies hat mich auch bewogen, die Zahl der einschlägigen Versuche neuerdings um zwei Reihen zu vermehren, um jeden Zweifel als ob es sich um Verunreinigungen mit anderen Pilzen handelte, zu beseitigen. Das Ergebniss blieb stets gleich.

Uebrigens fehlt es nicht in der Litteratur an analogen Beobachtungen.

So hat Klebs<sup>1)</sup> aus dem Bronchialsecret der Pneumoniker durch Züchtung auf Eiereiweiss Stäbchen erhalten, die sich in parallelen Reihen aneinander lagerten und dann in Platten regelmässiger Kugelmosaiken zerfielen.

Aehnliche Beobachtungen wurden auch von Prazmowski<sup>2)</sup> bei Untersuchung des *Clostridium Polymyxa* gemacht. Er fand ausser den für diese Gattung der Schizomyeeten charakteristischen Spindelstäbchen kürzere und längere Ketten von ovalen bis fast kugeligen Zellen, die an ihrer Verbindungsstelle entweder deutlich durch eine Querwand geschieden waren, oder noch häufiger blos eine starke Einschnürung zeigten; er sieht diese Bildung als Torulaketten des *Clostridium Polymyxa* an.

Da den früheren Untersuchern diese Wandelbarkeit der Formen des Harnstoffpilzes unbekannt war, so ist es erklärlich, dass sich ihre Beschreibungen desselben immer nur auf ein einziges Stadium beziehen.

So gibt Pasteur l. c. an, dass der Harnstoffpilz in der Regel in der Form von sehr kleinen rosenkranzförmig aneinander gereihten Kügelchen, von etwa 1,5 Mikromm.

<sup>1)</sup> Klebs: Beiträge zur Kenntniss der pathogenen Schizomyeeten VI. Archiv für experimentelle Pathologie, Bd. 4, S. 423. Tafel V. Fig. 3 und 4.

<sup>2)</sup> Prazmowski: Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bacterien-Arten. Leipzig 1879 S. 38, Fig. 7.

Durchmesser auftrete (2. Stadium meiner Beobachtung). Später gab Pasteur<sup>1)</sup> eine neue Abbildung des Harnfermentes und vergleicht es mit den von ihm im schleimigen Wein nachgewiesenen Pilzen, welche aus rosenkranzartig angeordneten Kügelchen mit einem Durchmesser von 0,2 Mikromm. bestehen.

Van Tieghem, loc. cit., beschreibt die Pilze als aus rosenkranzförmigen Ketten oder kleinen Haufen sphärischer Kügelchen (meine Zoogloeaform) bestehend, welche sich durch Knospung(?) vermehren sollen.

Cohn<sup>2)</sup> bestätigte die Pasteur'schen Befunde und fand, dass frischer, saurer Harn, nachdem er zwei Tage bei einer Temperatur von 30° C. an der Luft gestanden war, eine Trübung zeigte unter Entwicklung von Kugelbakterien, für welche er den Namen *Micrococcus uræ* vorschlug.

Es haben also auch die früheren Forscher ganz ähnliche Formen wie ich beobachtet und die Differenz in ihren Angaben über die Morphologie dieses Pilzes dürfte darauf zu beziehen sein, dass sie ihn immer bloß in einem der drei Stadien seiner Entwicklung beobachteten.

### Schlussbemerkungen.

Der Harnstoffpilz bedarf zu seiner Entwicklung des Phosphors, Schwefels, Sauerstoffs, Kaliums, Magnesiums, Kohlenstoffs und Stickstoffs.

Phosphor, Schwefel, Magnesium nimmt er in der Form von phosphorsaurem Kali und schwefelsaurer Magnesia auf.

Den Stickstoff entnimmt er mit Vorliebe dem Harnstoff, letzterer kann aber durch die Ammoniaksalze der Oxyfettsäuren, der Bernsteinsäure, durch die Amidofettsäuren, Asparaginsäure und Asparagin, oxaminsaure Salze, Kreatin, Pepton und hippursäure Salze ersetzt werden.

Als kohlenstoffhaltiges Material sind verwendbar: die Salze der Essigsäure, Milchsäure, Bernsteinsäure, Aepfelsäure,

<sup>1)</sup> L. Pasteur: Etudes sur le vins. Comptes rendus, T. LVIII, p. 142, 1864, Fig. II.

<sup>2)</sup> Cohn: Beiträge zur Biologie der Pflanzen. I. Band, Seite 158 bis 160.

Weinsäure, Citronensäure, Glycerin und die Zucker; weniger geeignet erschienen die Salze der Ameisensäure und Buttersäure mit fixer Basis, ungeeignet oxaminsaure, oxalsaure Salze, die Ammoniaksalze der Ameisensäure, Essigsäure und Buttersäure.

Die Ammoniaksalze von Bernsteinsäure, Milchsäure, Apfelsäure, Weinsäure, Citronensäure, Amidofettsäuren und Asparaginsäure sowie Asparagin, hippursäure Salze, Kreatin und Pepton sind im Stande ihm gleichzeitig den Stickstoff und Kohlenstoff zu liefern.

Der Harnstoffpilz zeigt drei Phasen seiner Entwicklung:

- 1) Die Stäbchenform,
- 2) Die Rosenkranzform,
- 3) Die Zoogloeaform.