[Aus dem Institut für Infectiouskrankheiten zu Berlin.]

Beiträge zur Ernährungsphysiologie des Tuberkelbacillus.¹

Von

B. Proskauer und M. Beck.

I.

In der Bakteriologie war bis vor Kurzem noch allgemein die Ansicht verbreitet, dass die Tuberkelbacillen zu ihrem Wachsthum einen Eiweiss enthaltenden Nährboden brauchen und dass ihr Wachsthum überhaupt ein sehr anspruchsvolles sei. Als Nährboden wurde neben dem Koch'schen Blutserum in der letzten Zeit fast allgemein nur das von Roux angegebene Glycerinagar oder die nach Koch mit 4 Procent Glycerin versetzte peptonhaltige Bouillon verwendet. Es zeigte sich aber nach den Untersuchungen Sander's,² dass die Tuberkelbacillen auch auf pflanzlichen Nährböden zu gedeihen vermögen, und dass vor Allem Kartoffelbrühe ihnen zu einem vortrefflichen Wachsthum ver helfe.

Einen weiteren Schritt vorwärts zur Darstellung von eiweiss- bzw. peptonfreien Nährböden für Tuberkelbacillen machte Kühne. Um zu constatiren, ob dieselben für ihr Wachsthum nothwendig Peptone bzw. Albumosen brauchen, hat er wegen der ungleichmässigen Beschaffenheit des Handelspeptons für die von uns bis jetzt empirisch angewandten Nährlösungen, deren Zusammensetzung complicirt und chemisch schwer zu definiren ist, nach dem Vorgange Pasteur's chemisch bekannte Ver-

¹ Eingegangen am 27. Juni 1894.

² Sander, Ueber das Wachsthum der Tuberkelbacillen auf pflanzlichen Nährböden. *Archiv für Hygiene*. Bd. XVI.

bindungen substituiert. Auf diese Weise wäre es auch wohl möglich, die dem Tuberculin innewohnende wirksame Substanz, die bei den bisherigen Versuchen zu ihrer Isolirung den aus Albumosen u. dergl. hauptsächlich bestehenden Niederschlägen in verschiedenen Mengen anhaftet, leichter zu isoliren.

In der That lässt es sich denken, dass zu dem Aufbau der Tuberkelbacillen nur ganz bestimmte Stoffe des Nährbodens und diese wieder in bestimmter Menge nothwendig sind, über deren Verbrauch nur ein chemisch genau definirtes Nährmaterial uns Rechenschaft geben kann. Wir müssen nach dem Vorgange der in der Agriculturchemie gemachten Erfahrungen, wo die Art und die Menge der für jede einzelne Pflanzengattung nothwendigen Nährstoffe bestimmt wird, auch den Tuberkelbacillen nur solche Stoffe zuführen, die sie völlig zu resorbiren vermögen. Daher muss uns in ernährungsphysiologischer Beziehung einmal die qualitative Zusammensetzung des Nährmediums interessiren, dann aber auch die Menge des Stoffumsatzes.

Wir haben demnach unsere ganze Arbeit, — die wir auf Veranlassung des Hrn. Geheimrath Koch ausgeführt haben, welchem wir an dieser Stelle für das Interesse und für seine Rathschläge zu grossem Danke verpflichtet sind, — in zwei Theile gegliedert, von denen wir hier zunächst den ersten, den qualitativen Theil folgen lassen, welcher die Beschaffenheit der Nährböden behandelt. Später werden wir über den zweiten Theil unserer Untersuchungen, den quantitativen, also den die Menge der verbrauchten Nährstoffe betreffenden, zusammenhängend berichten.

Kühne¹ hält die organischen Substanzen, die in dem Liebig'schen Fleischextracte vorhanden sind, im Allgemeinen für werthlos und nur die Mineralstoffe desselben zum Aufbau der Mikroorganismen für nothwendig. Deshalb benutzt er für seine Nährlösung die mit Milchsäure angesäuerte Asche des Liebig'schen Fleischextractes. Zum eigentlichen Nährboden giebt Kühne ausserdem den Tuberkelbacillen eine reiche Auswahl bekannter Spaltungsproducte der Proteine neben anderen für das Wachsthum der Bakterien schon bewährten organischen Verbindungen, ferner eine Schwefelverbindung und fügt dann zum Ganzen die Fleischextractasche, oder eine die letztere ersetzende künstlich zusammengesetzte Flüssigkeit „Aschenersatz“ hinzu, welcher hergestellt ist aus:

- 16.0 grm NaCl,
- 3.5 „ krystallisirtem Magnesiumsulfat,
- 1.5 „ gebranntem Gyps,

¹ Kühne, Erfahrungen über Albumosen und Peptone. V. Weitere Untersuchungen über die Proteine des Tuberculins. *Zeitschrift für Biologie*. Bd. XXX. p. 221.

- 2.5 ^{grm} gebrannter Magnesia,
- 62.13 „ trockener Pottasche,
- 7.35 „ Soda,
- 6.20 „ Ferrum reductum,
- 95.0 „ Phosphorsäure von 1.3 spec. Gewicht,
- 50—60 „ Milchsäure von 1.2 spec. Gewicht,

aufgekocht mit 600^{cem} Wasser. 12^{cem} dieser Flüssigkeit entsprechen etwa 10^{grm} des käuflichen Liebig'schen Fleischextractes und werden einem Liter Nährflüssigkeit zugesetzt. Die letztere selbst hat folgende Zusammensetzung: auf 1 Liter Flüssigkeit kommen neben 1.2^{cem} der oben genannten Mineralbestandtheile:

- 4.0 ^{grm} Leucin,
- 1.0 „ Tyrosin,
- 2.0 „ Asparagin,
- 2.0 „ schleimsaures Ammoniak,
- 0.5 „ Taurin,
- 40.0 „ Glycerin,
- 5.0 „ NaCl.

Nicht unerwähnt möchten wir an dieser Stelle lassen, dass schon lange vor dem Bekanntwerden der Kühne'schen Untersuchungen sich einer von uns (Proskauer) nach dem Vorgange Nägeli's u. A. mit der Herstellung eines wesentlich aus Asparagin bestehenden eiweiss- und peptonfreien Nährbodens beschäftigt hat. Wir haben aber trotzdem die Kühne'schen Untersuchungen aufgenommen und uns von der Ueppigkeit des Wachstums der Tuberkelbacillen auf der von Kühne angegebenen Nährlösung überzeugt. Wir konnten sehen, dass schon 4 Wochen nach der Impfung die Oberfläche der in Erlenmeyer'schen Kölbchen befindlichen Nährflüssigkeit mit einer dicken Haut von Tuberkelbacillen überzogen war; selbst bei Verdünnung der Lösung mit demselben Volumen Wasser konnte das Gleiche beobachtet werden.

Die Kühne'sche Lösung ist aber immer noch eine ziemlich complicirt zusammengesetzte und dürfte sich für die Anlage der Culturen in grösserem Maassstabe, u. A. schon wegen ihres hohen Preises, kaum empfehlen. Besonders zeitraubend ist die Darstellung der aus dem Fleischextract durch Versäuerung gewonnenen Mineralstofflösung, wogegen der zu gleichem Zwecke von ihm empfohlene künstliche „Aschenersatz“ leicht zu gewinnen ist.

Aus diesem Grunde haben wir eine Reihe von Versuchen ausgeführt, welche eine Vereinfachung einmal der den Kohlenstoff und den Stickstoff liefernden, dann aber auch der mineralischen Nährstoffe anstrebten. Kühne selbst hat bereits an eine Vereinfachung seines Nährgemisches gedacht

und zu diesem Zwecke einige der organischen Verbindungen weggelassen. Auch hinsichtlich der Mineralsalze finden sich in seiner Arbeit Andeutungen, welche eine Beschränkung der Anzahl derselben betreffen. So giebt Kühne an, dass auf einer „Pflanzennährlösung“, welche in 100^{cem} 0.2 Calciumnitrat, 0.05 Kaliumchlorid, 0.05 Magnesiumsulfat und 0.05 Monokaliumphosphat und ausserdem 3^{gram} Glycerin enthielt, die Tuberkelbacillen einen — wenn auch sehr geringen — Fortschritt in ihrem Wachstum zeigten.

Um zu erfahren, welche von den oben aufgezählten Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen die Tuberkelbacillen zum Aufbau ihres Körpers bedürfen, gingen wir von der gesammten Kühne'schen Nährlösung aus und liessen immer eine der organischen Verbindungen in derselben fort. Als mineralische Nährstoffe benutzten wir bald die nach Kühne's Vorschrift aus dem Fleischextract gewonnenen Mineralsubstanzen, bald seinen „Aschenersatz“ in der von ihm angegebenen Menge, welche beide sich im grossen Ganzen bezüglich ihrer Nährkraft als gleichwerthig erwiesen hatten.

Wir haben auf Tabelle I die Versuche zusammengestellt, wie sie sich ergaben nach Auslassung je einer der organischen Nährsubstanzen.

Tabelle I.

Zusammensetzung des Nährbodens für 100 ^{cem} Flüssigkeit	Geimpft am	Wachstum nach			
		8—14 Tagen	4 Wochen	6—8 Wochen	12 Wochen
Leucin 0, Tyrosin 0.1, Asparagin 0.2, schleimsaures Ammoniak 0.2, Taurin 0.05, Glycerin 4.0, NaCl 0.5, 1.2 ^{cem} Aschenersatz	21./V. 93	+ ¹	++	++	unter- gesunken
Leucin 0.4, Tyrosin 0, sonst wie oben	„	+++	+++	+++	+++
Wie oben, nur Asparagin 0	„	+++	+++	+++	+++
Wie oben, nur schleimsaur. Ammoniak 0	„	+++	+++	+++	+++
Wie oben, nur Taurin 0	„	+++	+++	+++	+++

¹ Das merkbare Eintreten des Wachstums ist mit + bezeichnet; mit ++ wurde bezeichnet, sobald etwa die Hälfte der Flüssigkeitsoberfläche bedeckt war. +++ bezeichnen vollständiges Bedecktsein der Oberfläche.

Aus diesen Resultaten entnehmen wir, dass die Tuberkelbacillen auf dem leucinfreien Nährboden etwas schlechter gewachsen sind, als auf den leucinhaltigen. Schon nach diesem ersten Versuche mussten wir daher dem Leucin eine gewisse Nährkraft den Tuberkelbacillen gegenüber zuschreiben. Wir werden aus dem Folgenden ersehen, dass dieser Schluss sich sehr oft bestätigt hat.

Es lag nahe, dem Kühne'schen Nährboden nunmehr je zwei der kohlenstoffhaltigen Substanzen zu entziehen, um auf diese Weise seinen allmählichen Abbau zu bewerkstelligen, und um schliesslich zu denjenigen Nährstoffen zu gelangen, welche das Fortkommen der Tuberkelbacillen nicht allein zu unterhalten vermögen, sondern auch für ihr Wachstum am vortheilhaftesten sind. Auf Tabelle II sind demgemäss abwechselnd von den fünf Kühne'schen organischen Nährstoffen je zwei weggelassen. Aschenersatz 1.2^{cem} pro 100 Flüssigkeit.

Tabelle II.

Nummer	Zusammensetzung des Nährbodens für 100 ^{cem} Flüssigkeit	Geimpft am	Wachstum nach			
			8-14 Tagen	4 Wochen	6-8 Wochen	12 Wochen
1	Leucin 0.4, Tyrosin 0.1, Asparagin 0.3, schleims. Ammon. 0, Taurin 0, NaCl 0.5, Glycerin 4	1893 22./VII.	+++	+++	+++	+++
2	Leucin 0.4, Tyrosin 0.1, Asparagin 0, schleims. Ammon 0.2, Taurin 0, NaCl 0.5, Glycerin 4	„	+	+++	+++	untergesunken
3	Leucin 0.4, Tyrosin 0, Asparagin 0.2, schleims. Ammon 0.2, Taurin 0, NaCl 0.5, Glycerin 4	„	+	+++	+++	+++ sehr üppig
4	Leucin 0, Tyrosin 0.1, Asparagin 0.2, schleims. Ammon 0.2, Taurin 0, NaCl 0.5, Glycerin 4	„	+	++	++	+++
5	Leucin 0.4, Tyrosin 0.1, Asparagin 0, schleims. Ammon 0, Taurin 0.05, NaCl 0.5, Glycerin 4	„	+	++	++	nichtweiter gewachsen
6	Leucin 0.4, Tyrosin 0, Asparagin 0.2, schleims. Ammon 0, Taurin 0.05, NaCl 0.5, Glycerin 4	„	+	+++	+++	+++
7	Leucin 0, Tyrosin 0.1, Asparagin 0.2, schleims. Ammon 0, Taurin 0.05, NaCl 0.5, Glycerin 4	„	+	+	+	++

Tabelle II (Fortsetzung).

Nummer	Zusammensetzung des Nährbodens für 100 ^{ccm} Flüssigkeit	Geimpft am	Wachstum nach			
			8—14 Tagen	4 Wochen	6—8 Wochen	12 Wochen
8	Leucin 0·4, Tyrosin 0, Asparagin 0, schleims. Ammon 0·2, Taurin 0·05, NaCl 0·5, Glycerin 4	1893 22./VII.	+	+++	+++	sehr üppig
9	Leucin 0, Tyrosin 0·1, Asparagin 0, schleims. Ammon 0·2, Taurin 0·05, NaCl 0·5, Glycerin 4	„	+	++	++	++
10	Leucin 0, Tyrosin 0, Asparagin 0·2, schleims. Ammon 0·2, Taurin 0·05, NaCl 0·5, Glycerin 4	„	+	+++	+++	+++

Wir können dazu bemerken, dass das Wachstum sich Anfangs schlechter anliess da wo Leucin oder Asparagin oder beide zusammen fehlten. Dies geht u. A. unzweideutig aus Nr. 9 hervor.

Nunmehr wurden drei der organischen Substanzen weggelassen, wobei sich ergab, dass auf den Leucin und Asparagin bzw. Leucin und schleimsaures Ammon enthaltenden Flüssigkeiten, welche wie sonst 4 Procent Glycerin, 0·5 Procent NaCl und 1·2^{ccm} Aschenersatz enthielten, die Tuberkelbacillen ebenso üppig wuchsen, wie in der ursprünglichen Kühne'schen Nährflüssigkeit, dagegen war auf den nur Leucin und Tyrosin enthaltenden Substraten das Wachstum ein geringeres. Auf Leucin und Taurin zeigte sich überhaupt kein Wachstum. Auch andere Versuche berechtigten uns zu dem Schlusse, dass das Taurin geradezu hemmend auf die Entwicklung der Tuberkelbacillen zu wirken vermag. Wir haben in Folge dessen das Taurin in unseren weiteren Versuchsreihen nicht mehr zur Anwendung gebracht.

Es blieb uns schliesslich nur noch übrig, die einzelnen organischen Substanzen für sich zu prüfen. Dabei konnten wir constatiren, dass in den Verhältnissen, wie sie Kühne anwendet, nur auf Leucin und auf Asparagin allein ein befriedigendes Wachstum der Tuberkelbacillen stattfand, während die übrigen auch nicht die Spur eines Wachstums zuließen. Beim Leucin und Asparagin vollzog sich aber noch die Entwicklung der Tuberkelbacillen, wenn wir nur 0·2 procent. Lösungen davon benützten.

An dieser Stelle möchten wir einfügen, dass wir im Anfang unserer Untersuchungen nach der Vorschrift von Kühne ein Leucin angewendet haben, das von Grübler in Leipzig durch Trypsinverdauung hergestellt

war. Wir fanden aber, dass jedes andere Leucin, z. B. das von Kahlbaum bezogene, dem Gröbler'schen an Nährwerth gleichkam.

Um aber für das theuere Leucin überhaupt einen billigeren Ersatz zu finden, suchten wir in der Reihe der organischen Verbindungen, welcher das Leucin angehört, also unter den Amidosäuren. Hierbei mussten wir selbstredend vor Allem auf das Alanin [Amidomilchsäure $\text{CH}_3\text{—CH}(\text{NH}_2)\text{—COOH}$] kommen.

In denselben Mengenverhältnissen wie das Leucin (von 0.4 bis 0.2 Procent abwärts) in Verbindung mit den Kühne'schen Mineralsalzen, 4 Procent Glycerin und 0.5 Procent Kochsalz, zeigte das Alanin sich als Nährstoff dem Leucin ebenbürtig. Wurde es, wie früher das Leucin, mit noch einem zweiten der Kühne'schen Kohlenstoffverbindungen zusammen gelöst, so traten genau dieselben Wachstumsverhältnisse wie bei der Combination des Leucins mit der betreffenden Verbindung ein. So konnten die Tuberkelbacillen z. B. bei

0.4 ^{grm} Alanin,	4.0 ^{grm} Glycerin,
0.2 „ Asparagin,	0.5 „ Kochsalz,
1.2 ^{ccm} Aschenersatz in 100 ^{ccm} Flüssigkeit	

zu einem üppigen Wachstum gebracht werden. Das Gleiche war der Fall bei Combination mit schleimsaurem Ammon.

0.4 Procent Alanin,
0.3 „ Asparagin,
0.3 „ schleimsaures Ammon,
im Uebrigen wie oben,

gaben einen Nährboden ab, der dem entsprechenden leucinhaltigen Nährboden in nichts nachstand. Alanin und Tyrosin zusammen verhielten sich wie Leucin + Tyrosin: das Wachstum der Tuberkelbacillen war ein beschränktes.

Auch die dem Alanin an Kohlenstoffgehalt vorhergehende Amidosäure, die Amidoessigsäure oder das Glycocoll ($\text{CH}_2\cdot\text{NH}_2\text{—COOH}$), in einem Procentgehalt von 0.3 angewendet, gab bei sonst gleicher Zusammensetzung der Nährflüssigkeit (Glycerin 4 Procent, NaCl 0.5 Procent und 1.2 ^{ccm} Kühne'sche Minerallösung) das nämliche Resultat wie die beiden anderen Amidosäuren.

Hieraus ersehen wir schon, dass die Amidosäuren, denn auch das Asparagin kann man dazu rechnen, als bevorzugte Nährstoffe für die Tuberkelbacillen zu gelten haben. Es lässt sich wohl annehmen, dass auch die übrigen Amidosäuren sich ebenso verhalten wie diese drei gewählten Repräsentanten. Dagegen scheinen die substituirten Amidosäuren, wie wir dies bei Versuchen einmal mit Sarcosin (Methylglycocoll) 0.4 Procent,

ferner mit Betain (Trimethylglycin), das wir als Chlorhydrat 0.4 procentig anwandten, drittens mit einer kaltgesättigten Lösung von Hippursäure (Benzoylglycocoll) wahrnahmen, für die Ernährung des Tuberkelbacillus sich nicht zu eignen, wenigstens konnten wir kein Wachstum auf den diese Verbindungen enthaltenden Nährböden sehen. Auch das Formamid haben wir zu unseren Versuchen herangezogen, jedoch ohne Erfolg.

Von dem Gedanken ausgehend, dass bei Gegenwart kohlenstoffreicher und durch Mikroorganismen leicht zersetzbarer organischer Verbindungen das Gedeihen der Tuberkelbacillen gefördert werde, haben wir die drei genannten Amidosäuren Leucin, Alanin und Glycocoll mit Dextrose zusammen verwendet: je 0.4 Procent der ersteren mit 0.2 Procent Dextrose, ausserdem 4 Procent Glycerin, 0.5 Procent NaCl und 1.2 ^{ccm} Mineralstofflösung gaben einen Nährboden ab, auf welchem 4 Wochen nach der Impfung fast die ganze Oberfläche mit einer Bakterienhaut bedeckt war. Sicherem Anschein nach hatte die Dextrose fördernd auf das Wachstum der Tuberkelbacillen eingewirkt.

Es lag daher nahe, den Traubenzucker direct in Verbindung mit einem einfachen Ammoniumsalz, welch' letzteres den Stickstoff für die Ernährung der Tuberkelbacillen liefern sollte, zu verwenden. Es zeigte sich in der That, dass auf einem Nährboden, der folgendermassen zusammengesetzt war: Traubenzucker 1 Procent, Salmiak 0.1 Procent, Kochsalz 0.5 Procent, Glycerin 4 Procent, das Wachstum der Tuberkelbacillen ein immerhin befriedigendes war. Wir haben dieses Ergebniss später, als wir ein einfacheres und besseres Gemenge von Mineralsubstanzen kennen gelernt hatten, weiter verwerthen können.

Besser als in der vorhergehenden Lösung kamen die Tuberkelbacillen auf einer 0.2 procentigen Glycosaminlösung fort bei sonst gleicher Zusammensetzung des Nährbodens. Sie waren hier nach drei Wochen ziemlich kräftig entwickelt.

Levulinsäure 0.4 Procent, die wir zusammen mit 0.2 Procent schleimsaurem Ammon benutzten, ergab kein positives Resultat.

Des Weiteren suchten wir zu ermitteln, wie sich als Kohlenstoff- und zugleich als Stickstoffquelle der Harnstoff, die Harnsäure und Abkömmlinge beider verhielten. Neben diesen Substanzen benutzten wir nur 4 Procent Glycerin, 0.5 Procent NaCl und 1.2 ^{ccm} Kühne'sche Fleisch-extractasche bezw. „Aschenersatz“.

Der Harnstoff in 0.6 procentiger Lösung gab kein Resultat;

Alloxan (Mesoxalylharnstoff) 0.4 Procent ebenso,

Alloxantin in 0.4 procentiger Lösung ebenso,

Allantoin in 0.4 procentiger Lösung ebenso.

Die Harnsäure, welche wir in einer Menge von 0.3 ^{grm} in 150 Wasser

aufschwemmten, in der Voraussetzung, dass, wenn sie als Nährstoff resorbirt, auch allmählich von den Tuberkelbacillen gelöst würde, liess zwar Anfangs ein ganz geringes Wachsthum erkennen, bald darauf aber wurden die Bakterien roth, ein Zeichen, dass sie abgestorben waren.

Das Caffeïn (Trimethylxanthin), als Vertreter der Xanthingruppe, liess in 0.4 procentiger Lösung keine Entwicklung zu.

Auf Guanin, welches zu 0.4 Procent der glycerin- und kochsalzhaltigen Aschenlösung zugesetzt wurde, liess sich nur ein kümmerliches Fortkommen erkennen.

Guanidinchlorhydrat (Imidoharnstoff) 0.4 Proc. bewährte sich nicht.

Das Lecithin, in Verbindung mit Glycogen, mit und ohne Glycerin, erwies sich, wie die Versuche zeigten, als ungeeignet für die Ernährung der Tuberkelbacillen: Das Impfmateriel sank nach kurzer Zeit in der Flüssigkeit unter. Letzteres konnte auch nicht verhütet werden, als wir der Flüssigkeit durch Zusatz von Traubenzucker, Dextrin u. dergl. ein höheres specifisches Gewicht zu geben suchten.

Schliesslich wollen wir noch erwähnen, dass auf einer 0.4 Procent Glycerin enthaltenden (also peptonfreien) Lösung von Liebig'schem Fleischextract die Tuberkelbacillen im Anfang etwas langsamer wuchsen, später aber ziemlich üppig gediehen.

Der aus dem Liebig'schen Fleischextract mit absolutem Alkohol gewonnene Auszug war selbst bei Gegenwart des Kühne'schen „Aschenersatzes“ wenig geeignet als Nährboden. Wahrscheinlich hatte sich bei der Entfernung des Alkohols durch Destillation ein Theil jener stickstoffhaltigen Substanzen zersetzt, welchen die Bacillen ihren Stickstoff entnehmen, denn während der Destillation entwichen grosse Mengen ammoniakalisch riechender und reagirender Verbindungen. Der in Alkohol unlösliche Theil des Fleischextractes, der mit und ohne Kühne'scher Mineralstofflösung angesetzt war, liess kein bemerkenswerthes Wachsthum zu.

Um zu sehen, ob die Tuberkelbacillen ihren Stickstoffbedarf aus der Luft zu beziehen vermögen, haben wir eine nur 4 Procent Glycerin enthaltende Flüssigkeit, der wie üblich, 0.5 Procent NaCl und 1.2^{cem} Aschenersatz bezw. Fleischextractasche zugesetzt war, geimpft, jedoch ohne ein Ergebniss zu erzielen. Die Tuberkelbacillen brauchen also gelöste N-haltige Stoffe zum Aufbau ihres Körpers.

Vorstehend hatten wir uns darüber orientirt, welche Arten organischer Verbindungen den Tuberkelbacillen als Nährstoff dienen können und dabei gefunden, dass selbst Traubenzucker und Salmiak als Kohlenstoff- und Stickstoffquellen für ihre Ernährung anzusehen sind. Nunmehr legten wir uns die gleiche Frage für die Mineralsubstanzen vor, denn bei der verhältnissmässig einfachen Zusammensetzung der Asche, welche die

Tuberkelbacillen bei der Verbrennung liefern, mussten wir annehmen, dass unter den vielen von Kühne angewandten Mineralsalzen schon wenige als Tuberkeldünger ausreichen würden.

In erster Linie suchten wir diejenigen Aschenbestandtheile des Fleisch-extractes zu verwerthen, welche in Wasser oder in Salzsäure bzw. Milchsäure löslich sind. Damit wollten wir zugleich eine Vereinfachung der Vorschrift für die Darstellung der Kühne'schen Fleischextractasche verbinden, falls andere nach gleicher Richtung hin im Gange befindliche Versuche keinen Erfolg gehabt hätten.

Die Aschenlösung wurde so gewählt, dass 5^{ccm} derselben stets 1^{grm} Fleischextract entsprachen. Diese Menge wurde auf 100^{ccm} aufgefüllt (= 1 Procent Fleischextractlösung) und ausserdem mit 4 Procent Glycerin, 0.5 Procent Kochsalz und 0.3 Procent Leucin bzw. Alanin versetzt. Die Resultate fielen aber hierbei nicht günstig aus, weshalb wir nun als Ausgangspunkt eine Pflanzenasche, nämlich die Cigarrenasche, wählten. Diese wurde mit Milchsäure (10 procentige Lösung) extrahirt und in solcher Menge als Nährboden verwandt, dass die Nährflüssigkeit 0.5 Procent Mineralsubstanzen enthielt. Wir konnten aber auch hier kein Wachsthum bemerken. Auf einem rein wässerigen Auszug der Cigarrenasche wuchsen die Tuberkelbacillen nur sehr kümmerlich.

Ferner benutzten wir die Asche der Tuberkelbacillen selbst neben Leucin und Alanin. 1.8^{grm} mit Alkohol abgetödtete und getrocknete Tuberkelbacillen lieferten beim Veraschen 0.125^{grm} mineralischen Rückstand, der sich in ganz verdünnter Milchsäurelösung fast völlig auflöste. 100^{ccm} dieser Lösung wurden mit 0.4 Procent Leucin und 0.1 Procent Alanin, ein Verhältniss, das sich sonst gut bewährte, ausserdem mit 4 Procent Glycerin und 0.5 Procent Kochsalz zusammengebracht und geimpft; das Resultat ermuthigte nicht zu weiteren Versuchen.

Auf dem Uschinsky'schen Nährboden,¹ der der Hauptsache nach aus Ammoniumlactat 1 Procent, Kochsalz 0.5 Procent, Calciumchlorid 0.01 Procent, Magnesiumsulfat 0.02 Procent und Dikaliumphosphat 0.02 Procent besteht und dem wir noch 4 Procent Glycerin zufügten, war kein Wachsthum zu constatiren.

Wir haben uns ferner, ausgehend von der Zusammensetzung der Tuberkelbacillenasche, einen Nährboden bereitet, welcher 0.25 Procent Natriumphosphat, 0.125 Procent Magnesiumchlorid und 0.5 Procent Kochsalz als Mineralsubstanzen enthielt; als kohlenstoff- und stickstoffhaltige Nährstoffe wählten wir 4 Procent Glycerin und 0.4 Procent Leucin. Dem Nährboden war noch ein kleiner Krystall von schwefelsaurem Kalium zugesetzt worden, welches als schwefelhaltiger Nährstoff dienen sollte. Auf

¹ *Centralblatt für Bakteriologie*. Bd. XIV. Nr. 10.

diesem sehr einfachen Nährboden zeigten die Tuberkelbacillen Anfangs ein sehr schwaches Wachsthum, später aber, nach vier Wochen, hatte dasselbe bedeutende Fortschritte gemacht und nach acht Wochen war die ganze Oberfläche mit einer schon im Untersinken begriffenen starken Decke von Tuberkelbacillen versehen. Dieser Versuch war der Ausgangspunkt für unsere weiteren Ermittlungen, denn wir erfuhren dadurch zunächst, dass von den Mineralstoffen ein Alkaliphosphat, ein Magnesiumsalz und geringe Mengen eines Sulfates bereits ausreichend seien. Bald hatten wir auch gemerkt, dass selbst das Kochsalz entbehrlich ist.

Während wir mit diesen letzteren Versuchen uns beschäftigten, erschien die Arbeit von Remy und Sugg,¹ in welcher ein von Petermann für die diagnostische Differenzirung der Typhusbacillen empfohlener Nährboden beschrieben ist. Derselbe besteht aus 0.1 Procent Traubenzucker, 0.5 Procent Asparagin, 0.075 Procent Citronensäure; als Mineralsubstanzen 0.5 Procent Trikaliumphosphat, 0.25 Procent Magnesiumsulfat, 0.25 Procent Kaliumsulfat und 0.15 Procent Kochsalz.

Die grosse Aehnlichkeit, welche diese Mineralstoffmischung mit derjenigen besitzt, welche wir bereits mit Erfolg angewendet hatten, veranlasste uns, diesen Nährboden noch mit 4 Procent Glycerin zu versetzen und für die Anlage von Tuberkelculturen zu verwerthen. Am 12. IX. 1893 wurde der erste Versuch angesetzt und am 13. X. 1893 bewies uns die Besichtigung der Culturen, dass bei Gegenwart von Glycerin auch der „Petermann'sche Nährboden“ für die Züchtung der Tuberkelbacillen ebenso vorthellhaft sei, wie derjenige von Kühne. Nach den Erfahrungen, welche wir bisher gemacht und oben mitgetheilt hatten, musste sich auch dieser Nährboden noch bedeutend einfacher gestalten lassen. Wir verfahren dabei in der gleichen Weise wie früher bei dem Abbau des Kühne'schen Nährbodens, indem wir von den organischen Stoffen einmal die Glycose wegliessen, also nur Asparagin und Citronensäure nahmen, dann wieder die Citronensäure wegliessen und Asparagin und Glycose anwandten, schliesslich Citronensäure und Glycose zusammen wegliessen, so dass wir nur noch Asparagin hatten. Auch andere organische Verbindungen zogen wir in den Bereich unserer Untersuchungen. Wie die nachstehenden Zusammenstellungen zeigen, konnten wir mit Vortheil selbst solche kohlenstoffhaltige Verbindungen hier verwenden, welche uns bei den früheren Versuchen mit den Kühne'schen Mineralstoffen im Stiche gelassen hatten.

Da der eine von uns (Proskauer) durch zahlreiche Bestimmungen festgestellt hatte, dass in einer gewöhnlichen Koch'schen, Glycerin und

¹ *Travaux de laboratoire d'Hyg. et Bact. de Gand.* 1893. Bd. I. (2). p. 68.

Pepton enthaltenden Fleischbrühe selbst bei einem Gehalt von 2 bis 4 Procent Glycerin derselben nach 8 wöchentlichem üppigen Wachsthum höchstens 1.5 Procent Glycerin von den Tuberkelbacillen aufgebraucht werden, dass ferner selbst bei 1 Procent Glycerin die Tuberkelbacillen noch gut fortkommen, so konnten wir auch bezüglich des Glycerins eine Verminderung auf 1 bzw. 1.5 Procent eintreten lassen. Ueber die Methode der Glycerinbestimmung und die Wiedergabe der einzelnen Resultate wird im Anschluss an die demnächst erscheinende Arbeit über den quantitativen Verbrauch der einzelnen Nährstoffe Mittheilung gemacht werden.

Alsdann haben wir definitiv nachgewiesen, was wir vorhin schon angedeutet hatten, dass auch das Kochsalz vollständig entbehrlich ist.¹ Schliesslich konnte auch auf das Kaliumsulfat verzichtet werden, weil in einer Mischung von Kaliumphosphat und Magnesiumsulfat die Bestandtheile dieses Salzes bereits anwesend sind. Von den drei chemisch möglichen Kaliumphosphaten wählten wir aus chemischen Gründen das Monokaliumphosphat.

Tabelle III giebt uns Auskunft über diese Versuche, welchen ausserdem noch solche hinzugefügt sind, wo wir das Asparagin in Verbindung mit Stoffen, welche die Citronensäure ersetzen sollen, benutzt haben. Bei einem Theil dieser Versuche tritt ein Ersatz von Magnesiumsulfat durch citronensaure Magnesia ein.

Tabelle III.

Nummer	Organ. Substanzen in Proc.		Mineralsalze in Proc.	Geimpft	Wachsthum nach			
					8—14 Tagen	4 Woch.	6—8 Woch.	12 Woch.
1	Asparagin 0.5 Citronensäure 0.075 Glycose 1.0 Glycerin 4.0		0.5 Kalium- phosphat 0.25 Magnesium- sulfat 0.25 K_2SO_4 0.15 NaCl	14./IX. 93	++	+++	—	—
2	Asparagin 0.5 Citronensäure 0.075 Glycose — Glycerin 4.0		„	19./XI. „	++	+++	+++	+++
3	Asparagin 0.5 Citronensäure — Glycose 1.0 Glycerin 4.0		„	19./XI. „	++	+++	+++	+++

¹ Eine Analyse der Asche von Tuberkelbacillen hat uns schon früher gezeigt, dass darin nur Spuren von Chloriden vorhanden sind. Dieselben stammten höchstwahrscheinlich von den den Bacillenleibern noch anhängenden Substanzen des Nährbodens ab, welche sich durch Auswaschen nicht vollständig entfernen liessen.

Tabelle III. (Fortsetzung.)

Nummer	Organ. Substanzen in Proc.	Mineralsalze in Proc.	Geimpft	Wachstum nach			
				8—14 Tagen	4 Woch.	6—8 Woch.	12 Woch.
4	Asparagin 0.5 Citronensäure — Glycose — Glycerin 4.0	Wie in Nr. 1	19./XI. 93	+	++	+++	+++
5	Wie Nr. 4 nur 1.5 Glycerin	„	27./XI. 93	++	++	+++	+++
6	Wie Nr. 1 ohne Glycerin	„	„	1 ¹	?	?	?
7	Asparagin 0.5 Glycerin 1.0	„	„	+	+	++	+++
8	Wie Nr. 2 nur Glycerin 1.0	ohne Kochsalz „ Kalium- sulfat	5./XII. 93	+	++	++	++
9	Asparagin 0.5 Milchsäure 0.1 Glycerin 1.0	Salze wie in Nr. 8	8./XII. 93	+	++	++	+++
10	Asparagin 0.5 Weinsäure 0.075 Glycerin 1.0	„	„	+	+	++	+++
11	Asparagin 0.5 Äpfelsäure 0.075 Glycerin 1.0	„	„	+	++	+++	+++
12	Asparagin 0.5 Bernsteinsäure 0.075 Glycerin 1.0	„	„	+	+	++	+++
13	Asparagin 0.5 Asparaginsäure 0.075 Glycerin 1.0	„	„	+	++	++	+++
14	Asparagin 0.5 Alanin 0.1 Citronensäure 0.1 Glycerin 1.0	„	23./XII. 93	nach 8 Tg. ² nach 14 Tg. ++	+++	+++	+++
15	Asparagin 0.5 Alanin 0.1 Glycerin 1.5	„	„	++	+++ ²	+++	+++
16	Asparagin 0.5 Glycerinsäure 0.075 Glycerin 1.0	„	„	+	+++ ³	+++	+++
17	Asparagin 0.5 Fumarsäure 0.075 Glycerin 1.5	„	„	+++	+++	+++	+++

¹ Kümmerliches, kaum merkbares Wachstum. ² Nach 3 Wochen, ³ Nach 3 Wochen.

Tabelle III. (Fortsetzung.)

Nummer	Organ. Substanzen in Proc.		Mineralsalze in Proc.	Geimpft	Wachsthum nach			
					8—14 Tagen	4 Woch.	6—8 Woch.	12 Woch.
18	Asparagin 0.5 Aconitsäure 0.075 Glycerin 1.5		Salze wie in Nr. 8	23./XII. 93 ¹	+	+++ ¹	+++	+++
19	Asparagin 0.5 Itaconsäure 0.075 Glycerin 1.5		„	„	+	++	+++	+++
20	Asparagin 0.5 Citraconsäure 0.075 Glycerin 1.5		„	„	+	++	+++	+++
21	Asparagin 0.5 Biuret 0.075 Glycerin 1.0		„	„	+	++	+++	+++
22	Asparagin 0.5 citronensaure Magnesia 0.25 Glycerin 1.5		MgSO ₄ 0.06 KH ₂ PO ₄ 0.5	„	+++	+++	+++	+++
23	Wie Nr. 22		MgSO ₄ 0.06 KH ₂ PO ₄ 0.3	„	++	+++	+++	+++
24	Wie Nr. 22		Wie Nr. 22 ²	26./I. 94	roth	—	—	—

¹ Nach 3 Wochen. ² Natriumfrei, mit Kaliumcarbonat alkalisch gemacht.

Wir sehen aus obiger Zusammenstellung, dass bei Gegenwart von kohlenstoffreichen Verbindungen, wie Citronensäure und Zucker, die Wirkung des Asparagins unterstützt wird und dass wir die Citronensäure auch durch andere Säuren, die nicht in die Citronensäurereihe gehören, mit Erfolg ersetzen können. Wir wollen gleich an dieser Stelle bemerken, dass es auch fettsaure Salze giebt, welche, wie die Citronensäure, als Nährstoffe den Tuberkelbacillen dargereicht werden können.

Die Versuche, bei denen wir mit dem Glyceringehalt bis auf 1 Procent heruntergegangen sind, beweisen, dass, wie schon oben bemerkt, dieser Procentgehalt für die Ernährung der Tuberkelbacillen zur Noth genügen dürfte. Der Ersatz eines Theiles des Magnesiumsulfats durch citronensaure Magnesia förderte die Entwicklung der Bacillen bedeutend (Nr. 22 u. 23).

Der Versuch Nr. 5 hat uns wieder gezeigt, dass das Asparagin allein neben 1.5 Procent Glycerin als organischer Nährstoff allen Anforderungen genügt und möchten wir gleich in diesem Theil anführen, dass wir mit dem Asparagingehalt sogar bis auf 0.1 Procent herabgehen konnten. Das Wachsthum auf solchen Nährböden mit absteigendem Asparagingehalt führt Tabelle IV vor.

Tabelle IV. Asparagin-Abstufungen.

Nummer	Organische Substanzen in Proc.	Mineral-substanzen in Proc.	Geimpft	Wachstum nach				
				8 Tagen	14 Tagen	4 Woch.	8 Woch.	12 Woch.
1	Asparagin 0.1 Glycerin 1.5	MgSO ₄ 0.25 KH ₂ PO ₄ 0.5	2./I. 94 26. I. „	—	—	—	++	+++
2	Asparagin 0.2 Glycerin 1.5	„	2./I. „ 26./I. „	—	—	—	++	+++
3	Asparagin 0.3 Glycerin 1.5	„	26./I. „	—	—	+++	+++	+++
4	Asparagin 0.4 Glycerin 1.5	„	„	—	+	+++	+++	+++
5	Asparagin 0.5 Glycerin 1.5	„	„	—	+	+++	+++	+++
6	Asparagin 0.6 Glycerin 1.5	„	„	—	+	+++	+++	+++

Bei der Prüfung des Kühne'schen Nährbodens wurde schon angegeben, dass Traubenzucker in Verbindung mit Salmiak befähigt ist, als Nährmaterial für die Tuberkelbacillen zu dienen. Dieser Versuch wurde wiederholt, indem wir statt der Kühne'schen Salze unsere einfache Mineralsalzmischung (Tab. III Nr. 8 u. s. w.) anwandten. Ausser dem Ammoniumchlorid nahmen wir auch Ammoniumsulfat und Ammoniumnitrat; ebenso wurde milchsaures und weinsaures Ammonium verwendet und zwar mit Erfolg wie nachstehende Tabelle V zeigt. Besonders hervorheben möchten wir den Versuch Nr. 4, 6 und 7 nachstehender Zusammenstellung.

Tabelle V.

Nummer	Kohlenstoff- und Stickstoffquelle in Procenten	Mineral-substanzen in Proc.	Geimpft	Wachstum nach			
				8 Tagen	14 Tagen	3 Woch.	4 Woch. u. spät.
1	Traubenzucker 1.0 Citronensäure 0.075 Salmiak 0.2 Glycerin 1.5	KH ₂ PO ₄ 0.5 MgSO ₄ 0.25 K ₂ SO ₄ 0.25 NaCl 0.12	31./XII. 93	+	+++	+++	+++ sinkt unter
2	Traubenzucker 1.0 Salmiak 0.2 Glycerin 1.5	„	„	+	++	+++	+++ ¹
3	Wie Nr. 2	KH ₂ PO ₄ 0.5 MgSO ₄ 0.25	17./I. 94	+	+	+++	+++

¹ Sehr dickes Wachstum.

Tabelle V (Fortsetzung).

Nummer	Kohlenstoff- und Stickstoffquelle in Procenten		Mineral-Substanzen in Proc.	Geimpft	Wachsthum nach			
					8 Tagen	14 Tagen	3 Woch.	4 Woch. u. spät.
4	Traubenzucker 1.0 Ammonsulfat 0.2 Glycerin 1.5		KH_2PO_4 0.5 Magnesiumcitronat 0.25	17./I. 94	+	++	+++ fängt an unter- zusink.	+++ ¹
5	Traubenzucker 1.0 Ammoniumnitrat 0.2 Glycerin 1.5		KH_2PO_4 0.5 MgSO_4 0.25	20./I. 94	+	+	+	++
6	Traubenzucker 1.0 Weinsaur. Ammon 0.2 Glycerin 1.5		Wie Nr. 1	31./XII. 93	+	+++ dick	+++ ²	+++
7	Wie Nr. 6		Wie Nr. 3	17./I. 94	+	++	+++	+++
8	Traubenzucker 1.0 Milchsaur. Ammon 0.2 Glycerin 1.5		Wie Nr. 1	31./XII. 93	+	+	++	+++ sinkt unter

¹ Nach 8 Wochen: sinkt unter, wächst aber an der Oberfläche weiter.

² Sinkt unter, wächst an der Oberfläche weiter.

Zu dieser Tabelle ist zu bemerken, dass die Flüssigkeit in Folge der Einwirkung des Alkalis auf den Zucker eine tiefbraune Färbung angenommen hatte. Die darauf geimpften Culturen wuchsen stark in die Dicke und ein grosser Theil der Bakterienhaut sank in Folge der eigenen Schwere zu Boden, während die auf der Oberfläche zurückgebliebenen Keime sich von Neuem entwickelten.

Es folgen im Anschluss daran einige Versuche über den Nährwerth der Kohlehydrate und der denselben nahestehenden Verbindungen (Tab. VI bis IX). Mit denselben wurden Vorversuche verknüpft, das für die Ernährung der Tuberkelbacillen so hochwichtige Glycerin durch diese Stoffe zu ersetzen. Die Glykose eignete sich, unseren vorläufigen Orientirungsversuchen zu Folge, als Glycerinersatz nicht, denn in der sie enthaltenden Nährlösung der Tab. V Nr. 7 trat beim Fehlen von Glycerin nur ganz geringes Wachsthum ein.

Die dem Traubenzucker isomere Mannose, welche wir von Kahlbaum als braune, syrupdicke Flüssigkeit bezogen, wurde in Mischungen, wie Tabelle VI zeigt, verwendet.

Tabelle VI.

Nummer	Kohlenstoff- und Stickstoffquelle, in Procenten		Mineral- substanzen, in Procenten	Geimpft am	Wachsthum nach		
					14 Tagen	4 Wochen	6 Wochen
1	Mannose 1.0 NH ₄ Cl 0.2 Glycerin 1.50	KH ₂ PO ₄ 0.5 MgSO ₄ 0.25	27./II. 94	++	+++	+++	
2	Mannose 1.0 Weinsaur. Ammon. 0.2 Glycerin 1.50	desgl.	„	+	+++	+++	
2b	desgl. ohne Glycerin	desgl.	„	—	—	—	
3	Mannose 1.0 Citronsaure. Magn. 0.25 Glycerin 1.50 (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.2	KH ₂ PO ₄ 0.5	„	+	+++	+++	
3b	desgl. ohne Glycerin	desgl.	„	—	—	—	

Das Wachstum der Tuberkelbacillen in den mannosehaltigen Flüssigkeiten war also bei Gegenwart von 1.5 Procent Glycerin ein gutes, während in den glycerinfreien Nährböden die Versuche negativ ausgefallen sind.

Bei Lävulose (Schering'sches Präparat) kamen wir zu nachstehenden Resultaten.

Tabelle VII.

Nummer	Kohlenstoff- und Stickstoffquelle, in Procenten		Mineral- substanzen, in Procenten	Geimpft am	Wachsthum nach			
					8 Tagen	14 Tagen	4 Woch.	6 Woch.
1	Lävulose 1.0 NH ₄ Cl 0.2 Glycerin 1.5	KH ₂ PO ₄ 0.5 MgSO ₄ 0.25	27./II. 94	?	+	++	++	
2	Lävulose 1.0 Weinsaur. Ammon. 0.2 Glycerin 1.5	desgl.	27./II. 94	—	+	++	++	
2b	desgl. ohne Glycerin	desgl.	17./III. 94	+	+	+	+	
3	Lävulose 1.0 Citronens. Magn. 0.25 Glycerin 1.5 (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.25	KH ₂ PO ₄ 0.5	27./II. 94	—	+	++	—	
3b	desgl. ohne Glycerin	desgl.	2./IV. 94	+	+	+	+	

Die Tuberkelbacillen wuchsen also auf Lävulose nicht so gut wie auf den beiden vorausgehenden Zuckerlösungen; auf den glycerinfreien Flüssigkeiten war ein geringer Fortschritt des Wachstums zu verzeichnen.

Von den Disaccharosen haben wir Rohrzucker, Milchzucker und Maltose, von den Trisaccharosen die Raffinose und zwar mit folgendem Erfolg (Tabelle VIII) geprüft.

Tabelle VIII.

Nummer	Kohlenstoff- und Stickstoffquelle, in Procenten	Mineral- substanzen, in Proc.	Geimpft am	Wachsthum nach					
				8 Tag.	14 Tagen	4 Woch.	4—8 Woch.	8—12 Woch.	
1 Proc. Rohrzucker mit:									
1	NH ₄ Cl 0.2 Glycerin 1.5	KH ₂ PO ₄ 0.5 MgSO ₄ 0.25	27./II. 94	—	+++	+++	+++	+++	+++ sinkt unter
2	Weins. Ammon. 0.2 Glycerin 1.5	„	„	—	+++	+++	+++	+++	+++
2b	desgl. ohne Glycerin	„	„	—	?	—	—	—	—
3	Citronens. Magn. 0.25 Glycerin 1.5 (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.2	KH ₂ PO ₄ 0.5	„	—	+++	+++	+++	+++	+++
3b	desgl. ohne Glycerin	„	„	—	—	—	—	—	—
1 Proc. Milchzucker mit:									
1	NH ₄ Cl 0.2 Glycerin 1.5	KH ₂ PO ₄ 0.5 MgSO ₄ 0.25	„	?	?	+++	+++	+++	+++ sehr dick
2	Weins. Ammon. 0.2 Glycerin 1.5	„	„	?	? ¹	—	++	++	++ sehr dick
2b	desgl. ohne Glycerin	„	17./III. 94	—	—	—	—	—	—
3	Citronens. Magn. 0.25 Glycerin 1.5 (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.2	KH ₂ PO ₄ 0.5	27./II. 94	—	++	+++	+++	+++	+++
3b	desgl. ohne Glycerin	„	„	?	—	—	—	—	—
1 Proc. Maltose mit:									
1	NH ₄ Cl 0.2 Glycerin 1.5	KH ₂ PO ₄ 0.5 MgSO ₄ 0.25	„	—	+	++	++	+++	+++
2	Weins. Ammon. 0.2 Glycerin 1.5	„	„	—	+	++	+++	+++	+++
2b	desgl. ohne Glycerin	„	17./III. 94	—	—	—	—	—	—
3	Citronens. Magn. 0.25 Glycerin 1.5 (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.2	KH ₂ PO ₄ 0.5	27./II. 94	—	++	+++	+++	+++	+++
3b	desgl. ohne Glycerin	„	„	—	—	—	—	—	—

¹ Reaction schwach sauer, nochmals alkalisch gemacht und geimpft.

Tabelle VIII (Fortsetzung).

Nummer	Kohlenstoff- und Stickstoffquelle, in Procenten	Mineral- substanzen, in Proc.	Geimpft am	Wachsthum nach				
				8 Tag.	14 Tagen	4 Woch.	4—8 Woch.	8—12 Woch.
	1 Proc. Raffinose mit:							
1	NH ₄ Cl 0·2 Glycerin 1·5	KH ₂ PO ₄ 0·5 MgSO ₄ 0·25	27./II. 94	—	+	++	+++	+++
2	Weins. Ammon. 0·2 Glycerin 1·5	„	„	—	++	+++	+++	+++
2b	desgl. ohne Glycerin	„	„	—	—	—	—	—
3	Citronens. Magn. 0·25 Glycerin 1·5 (NH ₄) ₂ SO ₄ 0·2	KH ₂ PO ₄ 0·5	„	—	++	+++	+++	+++
3b	desgl. ohne Glycerin	„	„	—	—	—	—	—

Die aufgeführten Disaccharosen und die Raffinose sind also als gute Nährmaterialien für die Tuberkelbacillen anzusehen; besonders gilt dies vom Rohrzucker.

Im Anschluss an die Kohlehydrate wurden die zu letzteren in naher chemischer Beziehung stehenden mehrwerthigen Alkohole Isodulcit, Mannit und Dulcit untersucht. Auch diese zeigten sich hinsichtlich ihrer Nährkraft den Zuckerarten ebenbürtig. Auf ihren glycerinfreien Nährböden entwickelten sich die Tuberkelbacillen ebenfalls nicht.

Tabelle IX.

Nummer	Kohlenstoff- und Stickstoffquelle, in Procenten	Mineral- substanzen, in Procenten	Geimpft am	Wachsthum nach			
				8—14 Tagen	14 Tag. bis 4 Woch.	4—8 Woch.	8—12 Woch.
	0·6 Proc. Isodulcit mit:						
1	Salmiak 0·2 Glycerin 1·5	KH ₂ PO ₄ 0·5 MgSO ₄ 0·25	15./III. 95	++	++	+++	+++
2	Weins. Ammon. 0·2 Glycerin 1·5	„	„	++	++	+++	+++
2b	desgl. ohne Glycerin	„	„	—	—	—	—
3	Citronens. Magn. 0·25 Glycerin 1·5 (NH ₄) ₂ SO ₄ 0·2	KH ₂ PO ₄ 0·5	„	++	++	+++	+++
3b	desgl. ohne Glycerin	„	„	—	—	—	—

Tabelle IX (Fortsetzung).

Nummer	Kohlenstoff- und Stickstoffquelle, in Procenten		Mineral- substanzen, in Procenten		Geimpft am	Wachstum nach			
						8—14 Tagen	14 Tag. bis 4 Woch.	4—8 Woch.	8—12 Woch.
	0.6 Proc. Mannit mit:								
1	NH ₄ Cl	0.2	KH ₂ PO ₄	0.5	17./I. 94 bz.	+	+	+++	+++
	Glycerin	1.5	MgSO ₄	0.25	26./I. 94				
1b	desgl. ohne Glycerin		"		"	—	—	—	—
2	Weins. Ammon.	0.2	"		"	++	++	+++	+++
	Glycerin	1.5							
2b	desgl. ohne Glycerin		KH ₂ PO ₄	0.5	26./I. 94	—	—	—	—
			MgSO ₄	0.25					
3	Citronens. Magn.	0.25	KH ₂ PO ₄	0.5	17./I. 94	+++ ¹	+++	+++ (dick)	+++ ²
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2							
	Glycerin	1.5							
3b	desgl. ohne Glycerin		"		"	—	—	—	—
4	Citronensäure	0.075	KH ₂ PO ₄	0.5	"	++	+++	+++ (dick)	+++
	NH ₄ Cl	0.2	MgSO ₄	0.25					
	Glycerin	1.5							
4b	desgl. ohne Glycerin		"		26./I. 94	—	—	—	—
	0.6 Proc. Duleit mit:								
1	NH ₄ Cl	0.2	KH ₂ PO ₄	0.5	27./II. 94	+	+++	+++	+++
	Glycerin	1.5	MgSO ₄	0.25					
2	Weins. Ammon.	0.2	"		"	+	+++	+++	+++
	Glycerin	1.5							
2b	desgl. ohne Glycerin		"		"	—	—	—	—
3	Citronens. Mg.	0.25	KH ₂ PO ₄	0.5	"	+	+++	+++	+++
	Glycerin	1.5							
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2							
3b	desgl. ohne Glycerin		"		"	?	—	—	—

¹ Schon nach 8 Tagen deutliches Wachstum. ² Thierversuch: Vor 8 Wochen tubercul. gemachtes Meerschweinchen reagirte auf 0.1 ccm Fl. von 37.9° bis 40.2°.

Die mehratomigen Alkohole stehen nach vorstehender Zusammenstellung den Zuckerarten an Nährkraft nicht nach. Von den auf Tab. IX verzeichneten Nährflüssigkeiten kann der mannit- und citronensäurehaltige Nährboden Nr. 3 und 4 als besonders geeignet für die Züchtung der Tuberkelbacillen im grösseren Maassstabe gelten. Auf demselben war das Wachstum der Bacillen schon nach 8 Tagen sehr weit fortgeschritten und nach 4 Wochen hatte sich eine Haut von mächtiger Dicke an der Oberfläche gebildet.

Tabelle X.

Nummer	Kohlenstoff- und Stickstoffquelle, in Procenten	Mineral- substanzen, in Proc.	Geimpft am	Wachstum nach					Bemerkungen
				8 Tag.	14 Tagen	4 Wochen	8 Wochen	12 Wochen	
1	Weinsaur. Ammon. 0.4 Glycerin 1.5	MgSO ₄ 0.25 KH ₂ PO ₄ 0.5	26./I. 94	?	?	?	++	+++	Thierversuch: 0.1 ccm einem vor 8 Wochen tubercul. gemachten Meerschw. injic.: ge- storben; Tuberculin- wirkung vorhanden. (1)
2	Weins. Ammon. 0.4 Citronens. Magnesia 0.25 Glycerin 1.5	"	"	?	+	+++	+++	+++	
3	Kohlens. Ammon. 0.3 Citronens. Magnesia 0.25 Glycerin 1.5	"	"	?	?	+(dick)	+++	+++	
4	Schwefels. Ammon. 0.3 Citronens. Magnesia 0.25 Glycerin 1.5	KH ₂ PO ₄ 0.5	17./III. 94	++	+++	+++	+++	+++	Thierversuch. Wie oben. Reaction von 37.5 bis 39.3° C. Thiervers. Meerschw. vor 4 Wochen infect.; 0.1 ccm infect. Reakt. von 38.4 auf 39.8° C. (1)
5	Kohlens. Ammon. 0.3 Ammoniumtartrat 0.2 Glycerin 1.5	Wie Nr. 1	22./III. 94	+	++	+++	+++	+++	
6	Citronensäure ¹ Ammoniumcarbonat 0.2 Glycerin 1.5	"	5./IV. 94	++	++	+++	+++	+++	
7	Ammoniumlactat 0.5 Glycerin 1.5	KH ₂ PO ₄ 0.5 MgSO ₄ 0.25	22./III. 94	?	+	+	+++	+++	(1)
8	Magnesiumlactat 0.25 Glycerin 1.5 (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.3	KH ₂ PO ₄ 0.5	"	+	++	+++	+++	+++	

¹ Als Ersatz für citronensaures Ammonium.

Die sich daran schliessenden Versuche bezweckten, zu erfahren, ob nicht Verbindungen von einfacherer chemischer Constitution als die bisher angewandten Kohlehydrate und mehratomigen Alkohole es sind, genügen, als Nährstoffe für die Tuberkelbacillen zu dienen.

Der Harnstoff in 0.2- und 0.5procentiger Lösung zusammen mit 0.5 Procent Monokaliumphosphat, 1.5 Procent Glycerin und 0.25 Procent Magnesiumsulfat führte zu keinem Resultat, auch wenn wir noch Weinsäure oder citronensaure Magnesia, die sich uns sonst bewährt hatten, der Nährlösung zufügten. Dagegen war sein Derivat, das Biuret, von vorzüglicher Nährkraft: 0.35procentige Lösungen davon genügten, um bei Gegenwart der sonst angewandten Mengen von Mineralstoffen und Glycerin schon nach 8 Tagen einen sehr deutlichen Fortschritt im Wachsthum hervorzurufen, so dass nach 4 Wochen die ganze Oberfläche bedeckt war.

Wir hatten in der Weinsäure und Citronensäure das Wachsthum kräftig fördernde Nährstoffe kennen gelernt. Dieselben wurden nun mit Kaliumphosphat und Magnesiumsulfat, beziehungsweise direct als Magnesiumsalze in Gegenwart eines der gewöhnlichen Ammoniumsalze verwerthet. Es entstanden auf diese Weise Nährflüssigkeiten, deren Zusammensetzung und Brauchbarkeit für die Züchtung der Tuberkelbacillen aus Tab. X hervorgeht. Dabei konnten wir uns überzeugen, dass das milchsaure Ammonium, sowie die milchsaure Magnesia den beiden genannten Säuren nicht viel nachstanden.

Unter den Nährböden letzterer Art befinden sich solche, welche ausgezeichnet für das Wachsthum der Tuberkelbacillen sind, wie dies aus Nr. 4, 5, 6 und 8 hervorgeht; man kann hierzu auch noch Nr. 2 rechnen. Die Flüssigkeiten zeichnen sich durch Farblosigkeit aus, sind theilweise auch klar und ohne Bodensatz und stimmen mit den alten Pasteur'schen Nährlösungen in vielen Punkten überein.

Ermuthigt durch diese letzten Erfolge, haben wir einen Versuch zu erwähnen, bei welchem der Kohlenstoff und Stickstoff den Tuberkelbacillen neben Glycerin nur in Form des kohlensauren Ammons geliefert wurde. Die Flüssigkeit hatte also folgende Zusammensetzung:

käufliches Ammoniumcarbonat . . .	0.35 Procent
primäres Kaliumphosphat	0.15 „
Magnesiumsulfat	0.25 „
Glycerin	1.5 „

Diese Mischung wurde am 26./I. 94. geimpft. In den ersten 4 Wochen war ein Wachsthum kaum zu bemerken; nach 6 Wochen hatte sich das Impfmateriel wohl nach der Dicke, nicht aber in die Breite aus-

gedehnt. Kurz darauf war die ganze Oberfläche mit einer Haut von Tuberkelbacillen überwachsen.¹

Auf dieser einfachen, vorwiegend aus anorganischen Substanzen bestehenden Mischung waren also die Tuberkelbacillen im Stande, ihren eiweisshaltigen Körper aufzubauen. Da dieser Nährboden die einfachste Zusammensetzung besitzt, die man sich als Nährsubstrat für pathogene Bakterien nur denken kann, so beansprucht er ein ganz besonderes Interesse. Er besitzt aber einen Nachtheil, der darin besteht, dass es auf ihm erst spät zu einem ausgiebigen Wachsthum kommt. Es muss also eine Substanz vorhanden sein, welche im Anfang entwicklungshemmend wirkt, die aber mit der Zeit zersetzt wird oder sich verflüchtigt. Denn nur so kann man es sich erklären, dass die Tuberkelbacillen im Anfang kümmerlich wachsen und erst später sich schnell vermehren. Diese entwicklungshemmende Substanz kann aber nur in dem benutzten Ammoniumcarbonat enthalten sein. Da das gewöhnliche Präparat aus dem prim. kohlensauren Ammonium und dem carbaminsauren Ammonium besteht, so muss festgestellt werden, welcher von diesen beiden Bestandtheilen der entwicklungshemmende ist. Wir sind mit Experimenten, welche diese Frage aufklären sollen, noch beschäftigt und hoffen bald darüber nähere Mittheilungen machen zu können.

Obgleich wir bereits sehr einfache und für die Praxis wohl geeignete Nährböden gefunden hatten und damit unser Thema eigentlich auch als erledigt gelten kann, haben wir doch aus rein wissenschaftlichem Interesse diese Untersuchungen noch weiter fortgesetzt und zunächst geprüft, ob nicht auch Kaliumnitrat oder Kaliumnitrit als Stickstoffquelle ausreichen. Jedoch zeigte es sich, dass die Tuberkelbacillen selbst in Gegenwart von solchen Stoffen, wie Mannit, Citronensäure u. s. w., welche kräftige Nahrungsmittel für sie sind, bei 0.2 Procent Salpetergehalt der Lösung nur eine schwache Entwicklung erkennen liessen. Natriumnitrit scheint direct giftig auf die Tuberkelbacillen einzuwirken.

Ferner dehnten wir unsere Untersuchungen noch auf eine Reihe organischer Säuren: Fettsäuren, Oxysäuren und Säuren der Oxalsäurereihe (Dicarboxylsäuren), aus.

Die Zusammensetzung der Nährböden war derartig gewählt, dass sie den Versuchen auf Tabelle X entsprach. Wir wählten 0.4procentige Lösungen der Ammoniumsalze allein oder bei Gegenwart von 0.6 Procent Mannit. Ausserdem wurde wieder wie gewöhnlich Monokaliumphosphat 0.5 Procent, Magnesiumsulfat 0.25 Procent als Mineralsubstanzen, sowie

¹ Tuberculinwirkung dieser Flüssigkeit: Ein vor 4 Wochen tuberculös gemachtes Meerschweinchen reagirte auf Injection von 0.1^{ccm} von 38.4° auf 39.9° C.

1.5 Procent Glycerin angewandt. In den Versuchen, wo die Magnesiumsalze der organischen Säuren benutzt wurden, kamen 0.25 Procent davon zur Verwendung, zusammen mit 0.6 Procent Mannit, 0.2 Procent Ammoniumsulfat, 0.5 Procent Kaliumphosphat und 1.5 Procent Glycerin. Viele der Säuren, wie Ameisensäure, liessen die Tuberkelbacillen ohne Mannit nicht zur Entwicklung kommen oder gaben nur ein spärliches Wachsthum. Am besten hat sich die Oxalsäure bewährt, wenn sie als oxalsaures Ammonium angewendet wurde; sie leistete das Nämliche wie citronensaures und weinsaures Ammon. Essigsäure Magnesia war einigermassen brauchbar, aber nur in mannithaltiger Flüssigkeit; propionsaures Ammon und propionsäure Magnesia leisteten zwar nicht ganz dasselbe, wie die Oxalsäure, erwiesen sich aber besser, wie die Essigsäure. Mallonsaures Ammonium mit und ohne Mannit stand ebenso, wie die mallonsäure Magnesia, der Propionsäure etwas nach. Die Verwendung der Buttersäure resp. Isobuttersäure und Oxyisobuttersäure bieten für die Züchtung der Tuberkelbacillen keine Vortheile. Bernsteinsäure und Aepfelsäure verhielten sich ähnlich, desgleichen Baldriansäure. Im Uebrigen sind diese Versuche noch nicht abgeschlossen, so dass ein definitives Urtheil darüber noch aussteht. Das Glycerin vermögen diese Säuren nach unseren Versuchen jedenfalls nicht zu ersetzen.

Schliesslich wollen wir noch kurz der eigentlichen Versuche gedenken, welche dahin zielten, für das Glycerin einen geeigneten Ersatz zu schaffen, beziehungsweise zu ermitteln, welchen Reihen die Stoffe angehören müssen, die man für das Glycerin substituiren kann.

So war die Glycerinsäure zu 1.5 Procent zusammen mit Asparagin 0.5 Procent, Glycose 0.05 Procent, KH_2PO_4 0.5 Procent, MgSO_4 0.075 und Magnesiumcitronat 0.25 Procent, also in einer sehr günstigen Zusammensetzung, nicht im Stande, das Glycerin zu ersetzen. Dasselbe gilt von der Glycerinphosphorsäure in der gleichen Concentration und Nahrungsmischung.

In der Voraussetzung, dass Fette und Oele als Triglyceride wie das Glycerin zu wirken vermögen, hatten wir zwei Emulsionen hergestellt, deren eine 1 Procent Olivenöl zu 0.5 Procent Asparagin, 0.25 Procent citronensaure Magnesia, 0.075 Procent Traubenzucker, 0.5 Procent KH_2PO_4 , 0.075 Procent MgSO_4 enthielt, während die andere aus 0.25 Procent citronensaurer Magnesia, 0.20 Procent Ammoniumtartrat, 0.075 MgSO_4 , 0.5 KH_2PO_4 bei gleichen Mengen von Olivenöl bestand. Nur auf der ersten kam es zu einem sichtbaren Wachsthum.

In gleichem Sinne wurden geprüft 1- und 2procentige Lösungen von Mannit, Dulcit, Isodulcit, Erythrit, Adonit, ferner Glycose, Lävulose, Mannose, Rohrzucker, Milchzucker, Maltose, Raffinose, weiter Inulin, Stärke,

Dextrin, Glycogen, Lävulinsäure, einige Glycoside, wie Arbutin und Phloridzin, und zwar in den für das Wachsthum denkbar günstigsten Mischungen. Ein sehr spärliches Wachsthum war zu merken auf Isodulcit, Mannose, Milchzucker, Dextrin, besser war das Wachsthum auf Lävulose und am besten auf Stärkelösung, wo die Tuberkelbacillen nach 3 Wochen schon die Hälfte der Flüssigkeitsoberfläche bedeckt hatten, dann aber in ihrem Wachsthum nicht mehr weiter fortschritten. Wunderbar muss es erscheinen, dass das Erythrit, welches als 4werthiger Alkohol dem Glycerin so nahe steht, uns dabei ganz im Stiche liess.

Bei dem grossen Interesse, welches gerade das Glycerin für die Ernährung der Tuberkelbacillen bietet, da es von diesen zu ihrem Körperaufbau besonders bevorzugt wird, haben wir unsere Bemühungen, einen auch für praktische Zwecke geeigneten Ersatz dafür zu finden, noch nicht aufgegeben und setzen diese Untersuchungen weiter fort. Auch sind über die Rolle, welche die Natriumsalze bei der Ernährung der Tuberkelbacillen spielen, Untersuchungen im Gange; wir sind dazu durch einen Versuch angeregt worden, welcher zeigte, dass auch auf kaliumfreien Nährböden die Tuberkelbacillen sehr gut zu wachsen im Stande sind.

Wir hoffen in unserer nächsten Abhandlung, welche über die quantitativen Ernährungsverhältnisse des Tuberkelbacillus Aufschluss geben soll, die hier noch offenstehenden Fragen zu beantworten.

Zum Schlusse wollen wir noch bemerken, dass wir durch eine Reihe von Thierversuchen unsere Culturflüssigkeiten auf ihre Tuberculinwirkung hin prüften, und dabei constatiren konnten, dass sämtliche Nährböden, auch die einfachst zusammengesetzten, eine solche auf tuberculöse Meerschweinchen ausübten.