III. Aus dem Kaiserlichen Institut für experimentelle
Medicin in St. Petersburg.

Zur Frage der Nährmedien für den Bacillus der Bubonenpest und sein Verhalten zu niederen Temperaturgraden.

Von A. Wladimiroff und K. Kresling.

I. Im December verflossenen Jahres erachtete es das Conseil des kaiserlichen Institutes für experimentelle Medicin zu St. Petersburg für angezeigt, zur Darstellung von Pestheilserum zu schreiten. Der eine von uns¹⁾ übernahm die Ausführung dieser Aufgabe, welche zunächst die Schranken einer experimentellen Arbeit an einigen wenigen Pferden nicht überschreiten sollte. Bald jedoch wuchs die Aufgabe bedeutend über das ursprünglich vorgesehene Maass hinaus, als von allerhöchster Stelle eine „besondere Commission zur Vorbeugung der Einschleppung der Pestepidemie in das Reich und zur Bekämpfung derselben“ unter dem Vorsitz seiner Hoheit des Prinzen Alexander Petrovitsch von Oldenburg eingesetzt wurde und genannte Commission das Institut mit der Massenanfertigung von Pestheilserum betraute.

Die bis dahin bekannt gewordenen Methoden der Vorbehandlung von Pferden zum Zwecke von Pestheilserumgewinnung konnten noch keineswegs als zufriedenstellend angesehen werden, da die Einführung sowohl von lebenden als auch von abgetödteten Mikroben in die Blutbahn, besonders wenn dies in grösseren Mengen geschieht, einen technisch groben und zugleich für das Versuchsobject aus mechanischen Gründen nichts weniger als ungefährlichen Eingriff darstellt.

Wir thaten uns deshalb zusammen, um die biologischen Eigenheiten der Pestbacillen besonders unter dem Gesichtspunkte der Toxingewinnung eingehender zu studiren. Hier war es in erster Linie die Nährmedienfrage, welche wir in Angriff nehmen mussten; denn, mochten die gesuchten toxischen Substanzen in den Bacterienleibern selbst enthalten sein, oder von den Mikroorganismen als Stoffwechselproducte in ihre Umgebung ausgeschieden werden — gleichviel, wir brauchten Substrate, auf oder in denen der Pestbacillus zu möglichst üppiger Entwicklung gelangen konnte.

Wir entschlössen uns, aus der grossen Reihe der damals angestellten Versuche einige mitzutheilen, in Anbetracht des erhöhten Interesses für die Bacteriologie der Pest, welche neuerdings durch zahlreiche, nicht immer in ihren Angaben übereinstimmende Veröffentlichungen zum Ausdruck kommt.

Die in den sofort näher zu beschreibenden Versuchen benutzten Culturen verdanken wir der Liebenswürdigkeit des Herrn Dr. Roux in Paris. Wir gaben denselben ihrer hohen Virulenz wegen den Vorzug vor einer ursprünglich von Kitasato stammenden Cultur, welche Herr Prof. Flügge in Breslau die Freundlichkeit hatte, dem Institut zu überlassen, welcher aber während des Transportes offenbar gelitten hatte.

Zunächst kam es uns darauf an, für flüssige Nährmedien den günstigsten Grad von Acidität oder Alkalescenz festzustellen, ferner die Bedeutung der einzelnen Bestandtheile des Substrates für den Wuchs der Pestbacillen zu prüfen.

Als Ausgangsmaterial und zugleich als Vergleichsobject für alle übrigen Beobachtungen diente uns eine Bouillon von folgender Beschaffenheit. Aus 500 g Rindfleisch wurde in der üblichen Weise 1 l Brühe hergestellt, mit 0,5 % NaCl und 1 % Pepton. sicc. (Witte) versetzt und mit Natronlauge genau neutralisirt, wobei Phenolphthalein als Indicator diente. Bei der Neutralisation wurde die Thatsache berücksichtigt, dass die Bouillon beim Kochen, resp. Sterilisiren schwach sauer wird; daher erhielt dieselbe einen solchen Alkalizusatz, dass in ihr vor dem Sterilisiren durch Phenolphthalein eine schwache Röthung entstand, nach dem Erhitzen dieses aber nicht mehr der Fall war, andererseits jedoch schon ein bis zwei Tropfen einer $\frac{1}{10}$ Normallauge genügten, um 10 cem

¹⁾ cf. A. Wladimiroff, Ueber die Technik der Pestserumbereitung. Wratsch 1897, No. 16 (russisch).

der fertigen Bouillon in Gegenwart von Phenolphthalein schwach zu röthen. Dieses Nährmedium bezeichnen wir mit No. 1.

Wenn man Bouillon von soeben beschriebener Beschaffenheit mit einer geringen Menge von Pestbacillen in Reincultur beschickt, so tritt bereits nach weniger als 24 Stunden eine leichte Trübung ein. Da wir unsere Culturen bei der täglichen Besichtigung wenigstens in den ersten Tagen erschüttern oder leicht schütteln, so bekommen wir ein Wachstum wie das des Streptococcus pyogenes fast nie zu Gesicht, was mit den Angaben Abel's¹⁾ über die Trübung gut im Einklange steht. Die Trübung ist zunächst eine so feine, dass man in ihr keine einzelnen größeren Partikel erkennen kann, sondern dass sie den Charakter eines zarten Wölkchens trägt, was besonders deutlich bei leichter Bewegung der Flüssigkeit hervortritt. Gleichzeitig bildet sich ein Bodensatz, der allmählich immer dichter wird, während in der darüber stehenden Flüssigkeit die Dichte der Trübung von unten nach oben merklich abnimmt. In älteren Culturen, welche längere Zeit unberührt im Thermostaten gestanden haben, werden die oberen Schichten fast völlig klar, aber es ziehen sich durch dieselben zähe weissliche Fäden zum Boden hin, herrührend von dem Oberflächenwachstum, welches unseres Wissens zuerst von Gabritschewski²⁾ erwähnt wird und das wir an üppigen Culturen nie vermissen. Auch Abel giebt an: „Vereinzelt wurde die Bildung eines Deckhäutchen oder eines Schleimringes an der Berührungsstelle von Oberfläche und Glaswand constatirt.“ Nach unseren Beobachtungen gehört der Ring bei günstigen Wuchsbedingungen zu den constanten Erscheinungen, während die Bildung von grösseren oder kleineren Deckhäutchenpartien mehr vom Zufalle abzuhängen scheint. Bei ganz alten Culturen von einem Monat und darüber schwinden die erwähnten Fäden immer und mehr, bis nach Erschöpfung des Nährbodens, über dem dichten schleimigen Bodensatz ziemlich scharf abgegrenzt, eine völlig klare Flüssigkeit absteht.

In den nachstehenden Versuchen wurden die zu prüfenden flüssigen Nährmedien zu 10 ccm in Probirgläsern gefüllt und nach dem Sterilisiren in möglichst gleichmässiger Weise geimpft. Zu diesem Zwecke bereiteten wir aus dem Bacterienrasen, welcher einer Agarreincultur von bekannter Virulenz entnommen wurde, eine auf das feinste vertheilte Aufschwemmung in Bouillon No. 1 und übertrugen davon mit ein und derselben Platinschlinge den Inhalt je einer Oese in jedes Gläschen der betreffenden Serie. Meist wurden sogar mehrere Serien gleichzeitig ausgesät. Schliesslich sei noch bemerkt, dass zu jeder Nummer mehrere Proben benutzt und alle Serien wiederholt angefertigt wurden.

Serie I: Einfluss der Alkalescentz auf das Wachstum der Pestbacillen.

Zu Bouillon No. 1 wurden verschiedene Mengen von Normal-Natronlauge zugesetzt, so dass die Alkalescentz der für den Gebrauch fertigen Bouillon betrug bei:

No. 2	0,02 % Na OH	= 0,5 ccm Normal Na OH in 100 ccm Bouillon
3	0,04 %	= 1,0 „ „ 100 „ „
4	0,06 %	= 1,5 „ „ 100 „ „
5	0,08 %	= 2,0 „ „ 100 „ „
6	0,10 %	= 2,5 „ „ 100 „ „
7	0,12 %	= 3,0 „ „ 100 „ „
8	0,16 %	= 4,0 „ „ 100 „ „
9	0,20 %	= 5,0 „ „ 100 „ „

Bei der ersten Besichtigung, 24 Stunden nach der Impfung, zeigen die Controllröhrchen No. 1 zarte gleichmässige (beim Schütteln wölkchenartige) Trübung und reichlichen Bodensatz, welcher sich durch Schütteln vollkommen vertheilen lässt, ohne Klümpchen zu hinterlassen. In No. 2 ist das Wachstum schon deutlich schwächer, und dasselbe nimmt mit steigender Alkalescentz beständig ab, bis es bei No. 6 völlig aufzuhören scheint. Was den Charakter der Trübung anbetrifft, so hat diese in No. 2 ein deutlich körniges Aussehen; desgleichen in No. 3, jedoch ist hier die Körnung feiner; von No. 4 an ist die Trübung wieder eine gleichmässige (wölkchenartige), aber sehr spärliche. Der Bodensatz von No. 2 steht an Menge hinter dem von No. 1 zurück und lässt sich durch Schütteln nicht vollkommen vertheilen; bei No. 3 ist derselbe noch spärlicher, und bei No. 4 kaum noch vorhanden.

Während der nachfolgenden Besichtigungen lässt sich ein spärliches Wachstum noch bis No. 7 incl. constatiren. Die beiden letzten Nummern bleiben offenbar steril, denn Ueberimpfungsversuche auf frische Substrate verlaufen resultatlos, und die vereinzelt in mikroskopischen Präparaten gefundenen Bacillen dürften auf das Aussaatmaterial zurückzuführen sein. Nach dem Aufschütteln der Culturen tritt der körnige Charakter der

¹⁾ Rudolf Abel, Zur Kenntniss des Pestbacillus. Centralblatt für Bacteriologie XXI, No. 13/14, 1897.

²⁾ G. Gabritschewski, Bacteriologie der Bubonenpest. Archives russes de Pathologie, de Médecine clinique et de Bactériologie Bd. II, No. 5, 1896 (russisch).

Trübung in No. 2 und No. 3 mit der Zeit weniger hervor, während er in den folgenden Proben immer deutlicher wird. Der Oberflächenring bildet sich in No. 2 ebenso gleichmässig und geschlossen wie in No. 1, mit steigender Alkalescentz kommt er jedoch nicht mehr zur Entwicklung.

Serie II: Einfluss von Salzsäure auf das Wachstum der Pestbacillen.

Die Salzsäure wurde zu Bouillon No. 1 in Form von Normallösung hinzugefügt. Die Acidität der fertigen Bouillon betrug bei

No. 10	0,018 % HCl	= 0,5 Normal-HCl in 100 ccm Bouillon
11	0,036 %	= 1,0 „ „ 100 „ „
12	0,054 %	= 1,5 „ „ 100 „ „
13	0,072 %	= 2,0 „ „ 100 „ „
14	0,090 %	= 2,5 „ „ 100 „ „
15	0,108 %	= 3,0 „ „ 100 „ „
16	0,144 %	= 4,0 „ „ 100 „ „

Bei der Besichtigung der einzelnen Proben dieser Reihe wurde auf dieselben Anzeichen geachtet, welche wir soeben bei der Alkaliserie besprochen haben: allgemeine, mit blossen Auge wahrnehmbare Wachsthumsmenge, Feinheit der Trübung, Masse und Lockerheit des Bodensatzes, Ringbildung. Nach 24 Stunden war No. 10 fast in allen Beziehungen der No. 3 vergleichbar. Mit steigender Acidität wurden die Culturen immer mangelhafter, bis bei No. 13 die Bacterienentwicklung überhaupt zweifelhaft erschien. Im weiteren Verlaufe zeigen sich jedoch noch Spuren von Wachstum bis No. 15, während die letzte Nummer steril bleibt. Zur Ringbildung kommt es nur in No. 10.

Serie III: Einfluss von Milchsäure auf das Wachstum von Pestbacillen.

Die Darstellung der Nährböden geschah in derselben Weise wie in der vorhergehenden Reihe. Die Säure wurde als Normallösung zugesetzt und die Acidität der fertigen Bouillon betrug bei:

No. 17	0,045 % C ₃ H ₅ O ₃	= 0,5 ccm Normalmilchsäure in 100 ccm Bouillon
18	0,090 %	= 1,0 „ „ 100 „ „
19	0,135 %	= 1,5 „ „ 100 „ „
20	0,18 %	= 2,0 „ „ 100 „ „
21	0,27 %	= 3,0 „ „ 100 „ „
22	0,36 %	= 4,0 „ „ 100 „ „
23	0,45 %	= 5,0 „ „ 100 „ „

In dieser Reihe ist das Wachstum im allgemeinen besser als in den beiden vorhergehenden. No. 17 unterscheidet sich nach 24 Stunden von No. 1 nur dadurch, dass die Trübung ein körniges Aussehen hatte. Wenn auch hier mit steigendem Säurezusatz die Mikrobenentwicklung schwächer wird, so erweist sie sich im Vergleich mit der HCl-Reihe doch noch bei einem höheren Aciditätsgrade als möglich. Nach eintägigem Verweilen im Thermostaten sind schon die Culturen bis No. 21 angegangen, und im weiteren Verlaufe zeigen auch die letzten Nummern der Serie unverkennbares Wachstum. Die Ringbildung steht in No. 17 nicht hinter der in No. 1 zurück; in No. 18 ist der Ring schwächer und nicht vollkommen geschlossen; in No. 19 finden sich von ihm nur noch stellenweise Andeutungen.

Aus diesen drei Versuchsreihen erscheint der Schluss gerechtfertigt, dass ceteris paribus die neutrale Reaction des Nährsubstrates für die Entwicklung der Pestbacillen die günstigste ist. In alkalischer Bouillon ist, wie auch Kolle¹⁾ bemerkt, das Wachstum spärlich, desgleichen in saurer; indessen macht sich hier ein bemerklicher Unterschied zwischen der durch HCl und der durch Milchsäure angesäuerten Bouillon geltend. Während bei ersterer ein Aciditätsgrad von 4,0 ccm Normalsäure auf 100 ccm Bouillon jede Entwicklung bereits völlig unterdrückt, wirkt ein Zusatz von 5,0 Normalmilchsäure zu 100 ccm Bouillon noch nicht unbedingt wuchsverhindernd. In dieser Beziehung stehen unsere Beobachtungen wiederum mit denen von Abel in Einklang. Wenn genannter Autor sagt: „eine Bouillon, die so sauer war, dass sie 10,5 ccm $\frac{1}{10}$ N.-NaOH auf 100 ccm zur Neutralisation erforderte, war noch ein guter Nährboden“, so meint er damit offenbar nicht künstlich sauer gemachte Bouillon, sondern solche, deren Acidität durch die aus dem Fleische herstammenden Säuren bedingt ist. Eine Bouillon von entsprechendem Säuregrad würde zwischen unseren No. 18 und No. 19 zu suchen sein, von denen wir erstere jedenfalls noch als erträglichen Nährboden anerkennen müssen.

Serie IV. Einfluss von Glycerin auf das Wachstum der Pestbacillen.

In dieser Reihe erhielt die Bouillon No. 1 Zusätze von reinem russischen Glycerin, und zwar in folgenden Proportionen:

No. 24	= 1 % Glycerin	No. 29	= 6 % Glycerin	No. 34	= 16 % Glycerin
25	= 2 %	30	= 8 %	35	= 18 %
26	= 3 %	31	= 10 %	36	= 20 %
27	= 4 %	32	= 12 %	37	= 25 %
28	= 5 %	33	= 14 %	38	= 38 %

¹⁾ W. Kolle, Zur Bacteriologie der Beulenpest. Deutsche med. Wochenschr. 1897, No. 10.

Nach 24 Stunden Aufenthaltes der entsprechenden Pestculturen im Thermostaten lässt sich bis No. 31 noch deutliche Bacterienentwicklung mit blossen Auge constatiren, während sie von Nr. 32 an bereits zweifelhaft erscheint. In den ersten beiden Nummern ist die Menge der gewachsenen Cultur eine recht beträchtliche und steht kaum hinter der in No. 1 zurück; die Trübung ist jedoch weniger fein und gleichmässig. Mit steigendem Glyceringehalt nimmt die Ueppigkeit der Culturen ab, die Körnung ihrer Trübung zu, ohne dass von scharfen Uebergängen etwas zu bemerken wäre.

Bei längerer Beobachtung erweist sich die Probe mit 2 % Glycerin (No. 25) als diejenige, in welcher die Pestbacillen relativ am reichlichsten zur Entwicklung kommen; auch bei mehrfacher Wiederholung des Versuches haben wir stets denselben Eindruck erhalten (Zählungen sind freilich nicht ausgeführt worden). Was die übrigen Proben anbetrifft, so gestattet uns deren Beobachtung nicht eine bestimmte Wachstumsgränze anzugeben. Die Trübung geht, mit steigendem Glyceringehalt immer abnehmend, bei No. 35 in eine Art von Opalescenz über, und ein Bodensatz findet sich noch in den letzten Proben der Reihe angedeutet. Controllaussaaten geben jedoch nach etwa 2 Wochen nur bis No. 35 incl. ein positives Resultat, aber auch schon bei letztgenannter nicht in allen Fällen. Das Oberflächenwachsthum lässt sich bis No. 31 (mit 10 % Glycerin) verfolgen.

Aus den soeben mitgetheilten Beobachtungen glauben wir folgern zu müssen, dass ein Zusatz von Glycerin zu neutraler Bouillon dieselbe in ihren Eigenschaften als Substrat für Pestbacillen nicht fördert, sondern eher ungünstig beeinflusst, dass aber andererseits ein sehr hoher Glyceringehalt der Bouillon erforderlich ist, um darin die Entwicklung der Pestbacillen völlig zu verhindern.

Um die Bedeutung des Glycerinzusatzes zu schwach saurer oder schwach alkalischer Bouillon kennen zu lernen, fügten wir zu den ersten beiden Proben der Serien I, II und III je 2 % Glycerin hinzu. Der Glyceringehalt von 2 % wurde deshalb gewählt, weil derselbe bei neutraler Bouillon, wie oben erwähnt, das relativ beste Wachsthum der Pestbacillen zuzulassen schien.

Im Vergleich zu den entsprechenden glycerinfreien Substraten zeigten die glycerinhaltigen ein in die Augen springendes geringeres Wachsthum der Pestbacillen, — ein Resultat, welches jedenfalls dazu angethan ist, das Glycerin als entwicklungshemmendes Agens für die in Frage stehenden Mikroben erscheinen zu lassen. Diese seine Eigenschaft kommt eben in neutraler Bouillon von der Zusammensetzung unserer Bouillon No. 1 nur weniger zur Geltung, als in Substraten, welche schon ohnehin ungünstigere Culturbedingungen für die Pestbacillen darbieten.

Serie V. Bedeutung der zur Bouillonbereitung benutzten Fleischsorten für das Wachsthum der Pestbacillen.

Zur Aufstellung dieser Versuchsreihe sind wir durch die Thatsache angeregt worden, dass in den südlichen und besonders südöstlichen Gebieten des Reiches Rindfleisch nicht immer leicht zu haben ist, während Hammel oder Hühner fast allenthalben ohne weiteres aufgetrieben werden können. Aus diesem Grunde kommt der Frage von den Fleischsorten für unsere in den Grenzgebieten wirkenden Collegen ein gewisses Interesse zu.

Die entsprechenden Bouillonarten wurden in völlig gleicher Weise und in unter einander gleichen quantitativen Verhältnissen dargestellt. Aus 500 g Fleisch wurde zunächst 1 l Bouillon mit einem Zusatz von 0,5 % NaCl angefertigt. Darauf fand eine Variation des Nährbodens durch die Neutralisation statt, schliesslich durch Neutralisation und Zusatz von 1 % Pepton. sicc.

a) Bouillon aus Rindfleisch.

No. 39. Einfache Bouillon mit Zusatz von 0,5 % NaCl nicht neutralisirt (Acidität: auf 100 ccm sind 2,6 ccm Normalnatronlauge zur Neutralisation erforderlich).

No. 40. Dieselbe Bouillon neutralisirt.

No. 41. Dieselbe Bouillon neutralisirt + 1 % Pepton.

b) Bouillon aus Hühnerfleisch.

No. 42. Einfache Bouillon + 0,5 % NaCl nicht neutralisirt (Acidität: auf 100 ccm 2,6 ccm Normalnatronlauge).

No. 43. Dieselbe Bouillon neutralisirt.

No. 44. Dieselbe Bouillon neutralisirt + 1 % Pepton.

c) Bouillon aus Schafffleisch.

No. 45. Einfache Bouillon + 0,5 % NaCl nicht neutralisirt (Acidität: auf 100 ccm 2,3 ccm Normalnatronlauge).

No. 46. Dieselbe Bouillon neutralisirt.

No. 47. Dieselbe Bouillon neutralisirt + 1 % Pepton.

In den drei nicht neutralisirten Bouillonproben (No. 39, 42, 45) kann das Wachsthum der Pestbacillen im allgemeinen als ein sehr geringes bezeichnet werden. Minimale Trübung, unbedeutender Bodensatz, von Oberflächenwachsthum nicht einmal eine Andeutung. Immerhin lassen sich noch gewisse graduelle Unterschiede erkennen, insofern als in der Hühnerbouillon eine relativ reichlichere Mikrobenentwicklung stattgefunden hat als in der Rinderbouillon, hinter welcher wiederum die Cultur auf Schafs-

bouillon zurückbleibt. Zur Erklärung dieser Unterschiede kann der Aciditätsgrad offenbar nicht herangezogen werden.

Das Aussehen der Culturen in neutralisirter (aber noch peptonfreier) Bouillon (No. 40, 43, 46) ist bereits ein viel günstigeres. Trübung und Bodensatz sind reichlicher, und es kommt ziemlich bald zu Oberflächenwachsthum. Auch hier zeichnet sich wiederum die Cultur auf Hühnerbouillon durch relative Ueppigkeit aus, während sich zwischen den beiden anderen kein merklicher Unterschied auffinden lässt.

Durch den Peptonzusatz zur neutralisirten Bouillon wird die Rinderbouillon (No. 41) unserem Pestsubstrat (No. 1) in jeder Beziehung gleich, was sich auch sofort durch vorzügliche Entwicklung der Pestbacillen kundgibt. Für die Hühnerbouillon (No. 44) scheint durch diesen Zusatz kaum etwas gewonnen zu werden: die Pestbacillen gedeihen in ihr nicht besser als vordem (in No. 43). Die Schafsbouillon (No. 47) hingegen steigt in ihrem Nährwerth für Pestbacillen durch die Zugabe von Pepton, jedoch nur um soviel, dass sie der Hühnerbouillon No. 44 gleichkommt, mithin immer noch hinter der Rinderbouillon No. 41, resp. No. 1 zurücksteht.

Serie VI. Gelatine-Pepton-Lösung als Nährboden für Pestbacillen.

Eine alkalische 2 %ige Peptonlösung mit Gelatinezusatz ist von Yersin¹⁾ und von Wilm²⁾ als sehr gutes Substrat für Pestbacillen angegeben worden. Wir stellten daher folgende zwei Nährlösungen her:

No. 48. Wässrige Lösung von Pepton. sicc. 2 %, NaCl 0,5 %, Gelatine alb. 2 %, mit NaOH bis zu kaum merklicher alkalischer Reaction neutralisirt (nach Yersin).

No. 49. Dieselbe Lösung, nur statt mit 2 %, mit 1 % Gelatine versetzt (nach Wilm).

Das Wachsthum der Pestbacillen erscheint in beiden Lösungen fast ganz gleich (vielleicht ist es No. 49 ein wenig reichlicher), und zwar nicht eben üppig. Während der ganzen Beobachtungszeit (mehr als ein Monat) bleibt es weit hinter den Culturen in Bouillon No. 1 zurück, indem die Trübung einen körnigen Charakter beibehält, der Bodensatz ein bescheidener bleibt und es zu keinem Oberflächenwachsthum kommen will. Wir müssen somit wiederum Abel recht geben, der ebenfalls, wenigstens für die Züchtung sogenannter Laboratoriumsculturen von Pestbacillen, die gewöhnliche Nährbouillon bevorzugt.

Zum Schluss haben wir noch einen kurzen, nur einmal ausgeführten Versuch zu erwähnen, welcher darin bestand, dass wir sowohl zu peptonfreier, als auch zu peptonhaltiger Rindfleischbouillon 1 %igen Traubenzucker hinzufügten und dieselbe nach genauer Neutralisation mit Pestbacillen impften. Wir haben in diesem einen Versuche die Angabe Kollé's nicht bestätigt gefunden, dass durch Zuckerzusatz ein üppiges Wachsthum bedingt wird. In der peptonfreien Zuckerbouillon ging die Pestcultur nur sehr dürrig an, aber auch in der peptonhaltigen Zuckerbouillon erschien die Cultur schon für das blosse Auge weniger üppig als in dem Vergleichssubstrat No. 1, welches sich von ihr ja nur durch die Abwesenheit von Zucker unterschied.

Der Versuch, die Reaction sämmtlicher flüssigen Pestculturen nach drei bis fünf Wochen mit ihrer ursprünglichen Reaction vor dem Besäen zu vergleichen, ist auf grosse Schwierigkeiten gestossen; denn die Substrate waren während des langen Aufenthaltes im Thermostaten concentrirter und somit auch dunkler geworden, was die Anwendung eines Indicators und das Erkennen der Endreaction sehr erschwerte. Im allgemeinen haben wir den Eindruck gewonnen, dass in nicht zuckerhaltigen Nährmedien weder die Alkalescenz, noch auch die Acidität durch das Wachsthum der Pestbacillen erhöht wird. Zahlen lassen sich hierfür leider nicht aufstellen.

II. Unsere Versuche über das Verhalten der Pestbacillen gegen niedrige Temperaturgrade können keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben. Es lag zunächst nur in unserer Absicht, den Einfluss der in unseren Breiten gewöhnlich bestehenden Wintertemperaturen auf Wachsthum und Virulenz der genannten Bacterien zu prüfen. Aeusserer Umstände haben uns leider nicht gestattet, die hierauf gerichteten Experimente in streng systematischer Weise durchzuführen.

Als wir am 12. Januar 1897 mit den Versuchen um die Mittagszeit begannen, zeigte das Thermometer im Freien nur — 6° C. Eine Cultur auf Agar und eine in Bouillon wurden zusammen mit einem Thermometer in offenem Glaszylinder für 3 1/2 Stunden im Freien aufgestellt. Am Ende dieser Zeit hatte der Frost zugenommen, und zwar bis — 12,5° C. Von den gekühlten Culturen wurden nach dem Aufthauen derselben Ueberimpfungen auf Nähragar ausgeführt, welche ein verschiedenes Resultat ergaben. Die auf der Agaroberfläche gekühlten Mikroben

¹⁾ Yersin, La peste bubonique à Hongkong. Annales de l'Institut Pasteur 1894.

²⁾ Wilm, Ueber die Pestepidemie in Hongkong im Jahre 1896. Hygienische Rundschau 1897, No. 5 und 6.

zeigten bereits am folgenden Tage typisches Wachstum, während die aus der gekühlten Bouillon übertragenen erst am zweiten Tage anfangen, sich in einzelnen grossen Colonien zu entwickeln. Eine Virulenzprüfung an Mäusen zeigte, dass die $3\frac{1}{2}$ Stunden bei $6-12,5^{\circ}\text{C}$ gehaltenen Pestbacillen an ihren pathogenen Eigenschaften nichts eingebüsst hatten.

Ein ganz ähnliches Ergebniss sahen wir in einem zweiten Versuche, welcher darin bestand, dass wiederum eine Agar- und eine Bouilloncultur, dieses Mal aber in Kältemischung von -21°C zum Gefrieren gebracht wurden. Die Bouillon war bereits nach zehn Minuten in Eis verwandelt. Die Kälteeinwirkung dauerte zwei Stunden, während der letzten zehn Minuten des Versuches stieg die Temperatur auf -16°C . Nachdem die Culturen im Thermostaten aufgethaut waren, wurden wie im ersten Versuche Ueberimpfungen ausgeführt. Auch hier zeigte sich auf den Controllröhrchen der Agarcultur schon am nächsten Tage typisches und üppiges Wachstum, während die Aussaaten von der Bouillon spät und spärlich angingen. Die Virulenz war in diesem Versuche ebenfalls unbeeinträchtigt geblieben.

Von einer an Pest gefallenen Maus, welche vier Stunden in einer Kältemischung von -21°C gelegen hatte, impften wir Herzblut und Milzpulpa auf verschiedene Substrate über und inficirten mit einer der reichlich gewachsenen Culturen von neuem eine Maus. Die Virulenz erwies sich hierbei als ebenso wohl erhalten wie die Wuchskraft.

Continuirliche und unterbrochene Kälteeinwirkung scheint identische Resultate zu ergeben. Wir liessen eine Bouilloncultur zwei Stunden lang in einer Kältemischung von -21°C stehen, während wir eine zweite ebensolche Cultur innerhalb derselben zwei Stunden beständig gefrieren und aufthauen liessen, indem wir sie auf je zehn Minuten in die Mischung und auf zehn Minuten in ein Wasserbad von 38°C stellten. In den Controllaussaaten beider Culturen trat die Bacterienentwicklung verzögert und spärlich ein, jedoch ohne dass eine Abschwächung der Virulenz zu constatiren gewesen wäre.

Gegen Ende Januar trat eine Periode von windstillen, klaren und schneefreien Tagen ein, welche es uns ermöglichte, einen etwas ausgedehnteren Gefrierversuch auszuführen. Die Anordnung des Versuches war folgende: Am 23. Januar wurden sechs Röhrchen mit Bouilloncultur und eines mit einer Agarcultur zugleich mit einem Thermometer in sehr weitem Glascylinder aufgestellt und auf einem Brett vor dem Fenster in einem festen Drahtkorb sicher angebracht. Um die Culturen gegen die ohnehin schwachen schräg auffallenden Strahlen der Januarsonne während der kurzen Insolationszeit zu schützen, verhängten wir noch den Korb mit einem Tuche. Vom 24. Januar an entnahmen wir dem Korb täglich eine Bouilloncultur und besäten von ihr nach dem Aufthauen drei Agarröhrchen. Nach sechs Tagen behandelten wir ebenso auch die obenerwähnte Agarcultur.

Die Temperatur, nur am Tage und im Glascylinder gemessen, schwankte folgendermaassen:

am 23. Januar zwischen -6°C und -11°C [Mittel der Tagesablesungen $-9,8^{\circ}\text{C}$],
 am 24. Januar zwischen -12°C und -18°C [Mittel der Tagesablesungen $-15,3^{\circ}\text{C}$],
 am 25. Januar zwischen $-11,5^{\circ}\text{C}$ und -18°C [Mittel der Tagesablesungen $-14,8^{\circ}\text{C}$],
 am 26. Januar zwischen -10°C und -13°C [Mittel der Tagesablesungen $-11,5^{\circ}\text{C}$],
 am 27. Januar zwischen -6°C und -19°C [Mittel der Tagesablesungen $-11,3^{\circ}\text{C}$],
 am 28. Januar zwischen $-3,5^{\circ}\text{C}$ und -9°C [Mittel der Tagesablesungen $-6,4^{\circ}\text{C}$],
 am 29. Januar zwischen -3°C und -9°C . [Mittel der Tagesablesungen $-6,0^{\circ}\text{C}$].

Die relativ höchsten Temperaturen fallen auf die wenigen hellen Stunden des Tages, die relativ niedrigsten sind am Morgen und Abend abgelesen worden; die noch niedrigeren Temperaturen der Nacht konnten leider nicht registrirt werden. Jedenfalls aber liegt das Mittel bedeutend tiefer, als in der Tabelle angegeben.

Die Controllaussaaten von den ein und zwei Tage lang dem Frost ausgesetzten Culturen zeigten erst nach zweimal 24 Stunden deutlich erkennbares Wachstum, welches späterhin sich in normaler Weise entwickelte. In den Controllculturen des dreitägigen Frostversuches zeigte sich erst am zweiten Tage eine einzige Colonie, während vom dritten Tage an in allen Röhrchen die Pestbacillen anfangen, typisch und reichlich zu wachsen. Nach viertägiger Kälteeinwirkung begann die Entwicklung einzelner grosser Colonien erst zwischen dem dritten und fünften Tage nach der Aussaat, aber es blieb keine der Controllculturen steril. Dagegen gingen von den Bouillonculturen, welche fünf und sechs Tage im Freien gestanden hatten, nicht alle Aussaaten an, und in den-

jenigen, welche nach 3—5 Tagen angingen, traten vorwiegend grosse Colonien auf.

Von den sechs Tage lang auf Agar eingefrorenen Pestbacillen erhielten wir sofort typische und üppige Culturen.

Wiederholte Virulenzprüfungen der in den Controllaussaaten dieses Versuches gewachsenen Mikroben liessen nicht die geringste Abschwächung derselben erkennen.

Soweit unsere Gefrierversuche überhaupt ein Urtheil gestatten, scheint der Einfluss niederer Temperaturen auf Pestbacillen ein ziemlich geringer zu sein, da wir als einzigen deutlichen Effect der Kälte eine Verzögerung im Wachstum constatiren konnten, und auch diese nur dann, wenn wir flüssige Culturen zum Gefrieren brachten.