

sprach, stellten Krönig und Paul<sup>1)</sup> quantitative Desinfektionsversuche an und gelangten bei Anwendung ihrer Granatenmethode zu recht günstigen Resultaten. Sie fanden z. B., daß Milzbrandsporen von der  $\frac{1}{8}$  normalen Sublimatlösung (1,69 %) nach 14 Minuten, der  $\frac{1}{16}$  normalen (0,84 %) in 30 Minuten, der  $\frac{1}{32}$  normalen (0,42 %) nach 70 Minuten, der  $\frac{1}{64}$  normalen (0,21 %) nach 80 Minuten und von der  $\frac{1}{128}$  normalen (0,115 %) in etwa zwei Stunden abgetötet waren.

Durch diese Arbeiten schien die Wirksamkeit des Sublimats endgültig ermittelt zu sein, und es mußte aufs höchste in Erstaunen setzen, als Ottolenghi zuerst in einigen vorläufigen Mitteilungen<sup>2)</sup> und dann in einer ausführlichen Publikation<sup>3)</sup> sehr ungünstige Resultate über die Wirkung des Sublimats veröffentlichte. Nach seinen Versuchen waren Milzbrandsporen nach einer neuntägigen Einwirkung einer  $\frac{1}{5}$  normalen (2,7 %) Lösung bei einer Temperatur von 14° noch entwicklungsfähig. Staphylokokken waren durch eine  $\frac{1}{10}$  normale (1,3 %) Lösung nach 24 Stunden noch nicht abgetötet; leider sind entsprechende Untersuchungen mit Staphylokokken von Krönig und Paul nicht ausgeführt worden. Die Unterschiede der Resultate von Ottolenghi und von Krönig und Paul beruhen auf einer vollständig neuen Untersuchungstechnik, die Ottolenghi angegeben hat.

Die Methode ist in kurzen Zügen die folgende:

Zu einem gemessenen Volumen filtrierter wäßriger Bakterienaufschwemmung fügt man vorsichtig ein ebenfalls gemessenes Volumen des Desinfektionsmittels. Aus praktischen Gründen wählt man das Verhältnis dieser beiden Volumina wie 1 : 9. Nach bestimmten Zeiten entnimmt man abgemessene Proben dieses Gemisches (0,5—1 cem), überträgt sie in Kölbchen, die 10 cem sterile Bouillon enthalten. Nun fügt man hierzu gemessene Mengen Schwefelwasserstofflösung bestimmter Konzentration und nach Ablauf von etwa 20 bis 30 Minuten 10 cem sterilisiertes Ochsenblutserum. Zur Kultur werden die so präparierten Kölbchen in den Thermostaten bei 37° C gestellt. Nach Verlauf von ein bis zwei Tagen überträgt man zur Identifizierung der angewendeten Bakterienspezies eine größere Oese des Kolbeninhaltes auf Agarplatten.

Die Gesichtspunkte, die Ottolenghi zur Vornahme dieser Methode veranlaßten, waren folgende: Es ist bekannt, daß zur Neutralisation des an die Bakterien gebundenen Sublimats ein gewisser Ueberschuß von Schwefelwasserstoff resp. Schwefelalkalien Verwendung finden muß, um die mit den Bakterien eingegangene Bindung wieder zu lockern. Ein großer Ueberschuß muß aber andererseits wieder vermieden werden, weil Schwefelwasserstoff selbst bakterizide Eigenschaften besitzt. Aus den umfangreichen vergleichenden Untersuchungen Ottolenghis geht hervor, daß die Giftigkeit von Schwefelwasserstoff, Schwefelammonium und Ammoniumsulfhydrat für die verschiedenen Bakterienspezies ungefähr die gleiche ist. Ottolenghi zog für die Versuche ersteren vor, weil er leicht frisch zu bereiten und auf einfache Weise zu bestimmen und zu dosieren ist. Die Unterschiede der Resultate von Krönig und Paul mit denen von Ottolenghi liegen also nicht in der Verwendung von Schwefelammonium bzw. Schwefelwasserstoff, sondern im Zusatz des Serums, welches nach Ottolenghis Untersuchungen die Schädigung des Neutralisationsvorganges beträchtlich vermindert. Um diesen vollständig zu machen, d. h. um dem Schwefelwasserstoff Gelegenheit zu geben, auch in das Innere der Bakterienzelle einzudringen, muß mit dem Serumzusatz eine gewisse Zeit gewartet werden.

Bei der ausgedehnten Anwendung, die das Sublimat trotz seiner Giftigkeit findet, sind diese Resultate bemerkenswert.

Aus der Chemischen Abteilung des Instituts für Infektionskrankheiten in Berlin. (Direktor: Geh. Ober-Med.-Rat Prof. Dr. Gaffky, Abteilungsvorsteher: Prof. Dr. Lockemann.)

### Vergleichende Untersuchungen über die Desinfektionswirkung von Sublimat und Sublamin.

Von Dr. Fr. Croner und Dr. C. Naumann.

Nachdem Geppert<sup>1)</sup> 1891 gezeigt hatte, daß die Wirkung des Sublimats nicht ganz den Angaben früherer Autoren ent-

<sup>1)</sup> Deutsche medizinische Wochenschrift 1891, S. 1065.

<sup>1)</sup> Zeitschrift für Hygiene 1897, Bd. 25, S. 1.

<sup>2)</sup> Desinfektion 1909, Bd. 2, S. 105; ebenda 1910, Bd. 3, S. 73.

<sup>3)</sup> Ebenda 1911, Bd. 4, S. 65 und 113.

Es erschien deshalb notwendig, die Methode einer Nachprüfung zu unterziehen. Gleichzeitig war es von Interesse festzustellen, ob auch andere Quecksilberverbindungen, wenn sie in der gleichen Weise geprüft wurden, ebenso eine beträchtliche Verminderung ihrer bisher angenommenen Wirkung ergaben.

#### A. Versuche mit Sublimat.

(Zum Teil unter Mitarbeit von Herrn Dr. E. Ritter.)

Zu unseren Versuchen wählten wir Sporen einer mehrtägigen Kultur des Milzbrandbacillus, die gegen strömenden Wasserdampf eine Resistenz von 2—2,5 Minuten hatten, und 24 stündige Kulturen eines resistenten Laboratoriumstammes von *Staphylococcus pyogenes aureus*. Die Agarkulturen wurden mit je 10 ccm sterilisierten Wassers abgeschwemmt, mit Glasperlen geschüttelt, sodaß eine möglichst homogene Emulsion entstand, und diese alsdann filtriert. Durch Bestimmung der Keimzahl überzeugten wir uns, daß reichliche Mengen von Bakterien in den Emulsionen vorhanden waren.

Zu den Versuchen verwendeten wir Sublimatlösungen, deren Konzentrationen so bemessen waren, daß beim Zusammenbringen von neun Teilen dieser Lösung mit einem Teil Bakterienaufschwemmung die Mischung  $\frac{1}{5}$  normaler (2,712 %),  $\frac{1}{10}$  normaler (1,356 %),  $\frac{1}{25}$  normaler (0,542 %),  $\frac{1}{50}$  normaler (0,271 %),  $\frac{1}{100}$  normaler (0,136 %),  $\frac{1}{500}$  normaler (0,027 %) und  $\frac{1}{1000}$  normaler (0,013 %) Sublimatlösung entsprach. Hieraus ergibt sich, daß die zu verwendenden Konzentrationen der Sublimatlösung 10 % höher als die entsprechenden Normalkonzentrationen sein müssen. Die  $\frac{1}{100}$  normale (0,135 %) Lösung entspricht ungefähr der in der Praxis angewendeten Lösung von 1 pro mille Sublimat.

Zur Kultivierung wurden Kölbchen von 100 ccm Inhalt verwendet, die 10 ccm sterile Bouillon enthielten. Der Schwefelwasserstoff wurde in steriles Wasser mittels sterilem Glasrohr eingeleitet, der Gehalt des Schwefelwasserstoffwassers wurde alsdann durch Titration mit Jodlösung bestimmt und jenes, wenn nötig, mit sterilem Wasser verdünnt. Zu den Versuchen ließ man es aus sterilisierter Bürette ausfließen.

Die Keimfreiheit des durch Pasteurisierung sterilisierten Serums wurde vor jedem Versuch durch Anlegung besonderer Kontrollen festgestellt.

Um die Resultate dieser Versuche gut vergleichen zu können, wurden sie sämtlich nach der oben beschriebenen Methode ausgeführt. Die Gemische von Bakterienemulsion und Sublimat wurden unter Lichtabschluß bei möglichst gleichmäßiger Temperatur (17—18°) aufbewahrt. Ottolenghi hat durch Versuche festgestellt, daß die in den Kölbchen entwickelten Keime nicht pathogen sind; sie erlangen ihre ursprüngliche Pathogenität jedoch wieder durch Passage eines Nährbodens. Wir haben auch zur vollständigen Identifizierung der erhaltenen Kulturen den Tierversuch in einigen Fällen angewendet.

Bereits nach dem Erscheinen der ersten Publikation von Ottolenghi wurde von dem einen von uns in Gemeinschaft mit E. Ritter eine Nachprüfung der mitgeteilten Angaben vorgenommen, nachdem uns Ottolenghi in dankenswerter Weise privatim nähere Angaben über die von ihm verwendete Methode gemacht hatte. Bezüglich der Konzentration des zuzusetzenden Schwefelwasserstoffwassers wurde angenommen, daß diese den verschiedenen Sublimatkonzentrationen äquivalent sein müsse, d. h. daß man z. B. für die  $\frac{1}{100}$  normale Sublimatlösung auch  $\frac{1}{100}$  normalen Schwefelwasserstoff und bei  $\frac{1}{1000}$  normaler Sublimatlösung analog  $\frac{1}{1000}$  normales Schwefelwasserstoffwasser verwenden müsse. Die übrige Anordnung der Versuche entsprach in allen Einzelheiten den vorstehend aufgeführten Versuchsbedingungen. Das überraschende Ergebnis dieser mehrfach ausgeführten Versuche war das folgende:

#### 1. Versuche mit Milzbrandsporen.

Es wurden 0,5 ccm des Bakteriensublimatgemisches der Nährbouillon zugesetzt und dann steigende Mengen entsprechend äquivalenten Schwefelwasserstoffwassers zugefügt, sodaß im Maximum ein sechsfacher Überschuß von diesem im Gemisch vorhanden war.

In den folgenden Tabellen bedeutet das Zeichen + Wachstum, das Zeichen — kein Wachstum.

Vorversuch. (Tabelle I.)

Sublimatkonzentration	Versuchsdauer				
	24 Stunden	2 Tage	9 Tage	11 Tage	15 Tage
$\frac{1}{5}$ n = 2,712 %	+	+	+	+	—
$\frac{1}{10}$ n = 1,356 %	+	+	+	+	—
$\frac{1}{25}$ n = 0,542 %	+	+	—	—	—
$\frac{1}{100}$ n = 0,136 %	+	—	—	—	—
$\frac{1}{500}$ n = 0,027 %	—	—	—	—	—

Es zeigte sich bei diesen Versuchen, daß bei den verdünnten Lösungen nach 24 Stunden überhaupt kein Wachstum zu beobachten war, während bei konzentrierteren die Abtötung erst nach Verlauf von 15 Tagen eintrat. Dies schien dafür zu sprechen, daß das Sublimat in geringeren Konzentrationen eine stärkere Wirkung auszuüben imstande sei als in höheren Konzentrationen. Dieselben Verhältnisse zeigten sich auch bei Versuchen mit *Staphylokokken*.

Durch Weggang des Herrn Ritter aus dem hiesigen Institut wurden die Versuche unterbrochen und erst wieder aufgenommen, nachdem die ausführliche Publikation Ottolenghis erschienen war. Nach dem Wortlaut seiner Angaben war die bisher angewendete Methodik vollständig richtig gewesen, bei einer Durchsicht seiner Tabellen zeigte sich indessen, daß bei den verdünnten Lösungen ein viel höherer Schwefelwasserstoffzusatz zu verwenden ist. Während bei  $\frac{1}{5}$  normalem Sublimat eine drei- bis fünffache äquivalente Menge genügt, sind für z. B.  $\frac{1}{1000}$  normales eine etwa 400fache äquivalente Menge zuzusetzen; mit steigender Einwirkungsdauer muß man diesen Ueberschuß sogar noch erhöhen. Ottolenghi erklärt diese Technik nicht näher, unsere Versuche haben indessen ergeben, daß man tatsächlich so verfahren muß. Auf diese Frage werden wir später noch zurückkommen.

Zu den nachstehenden Versuchen verwendeten wir analog den Angaben Ottolenghis nur  $\frac{1}{5}$  normales Schwefelwasserstoffwasser in Mengen von 1—5 ccm.

#### Versuche mit Milzbrandsporen.

##### Versuch 1. (Tabelle II.)

Sublimatkonzentration	Versuchsdauer			
	1 Tag	2 Tage	3 Tage	4 Tage
$\frac{1}{5}$ n = 2,712 %	+	+	+	+
$\frac{1}{25}$ n = 0,542 %	+	+	+	+

##### Versuch 2. (Tabelle III.)

Sublimatkonzentration	Versuchsdauer			
	2 Tage	4 Tage	6 Tage	8 Tage
$\frac{1}{5}$ n = 2,712 %	+	+	+	+
$\frac{1}{25}$ n = 0,542 %	+	+	+	+
$\frac{1}{50}$ n = 0,271 %	+	+	+	+
$\frac{1}{100}$ n = 0,135 %	+	+	+	+

##### Versuch 3.

Angewendet die gleiche Konzentration wie bei Versuch 2, Resultat: Nach sieben Tagen in allen Proben vollständiges Wachstum.

##### Versuch 4. (Tabelle IV.)

Sublimatkonzentration	Versuchsdauer			
	2 Tage	4 Tage	7 Tage	11 Tage
$\frac{1}{100}$ n = 0,135 %	+	+	+	+
$\frac{1}{500}$ n = 0,027 %	+	+	+	+
$\frac{1}{1000}$ n = 0,013 %	+	+	+	—

Diese Resultate zeigen eine Uebereinstimmung mit den von Ottolenghi angegebenen, der auch nach verschiedenen Zeiträumen mit den verschiedenen Sublimatkonzentrationen keine endgültige Abtötung der Milzbrandsporen feststellen konnte.

##### Versuch 5. (Tabelle V.)

Sublimatkonzentration	Versuchsdauer				
	7 Tage	14 Tage	21 Tage	28 Tage	37 Tage
$\frac{1}{5}$ n = 2,712 %	+	+	+	± <sup>1)</sup>	—
$\frac{1}{100}$ n = 0,135 %	+	+	+	+	—

<sup>1)</sup> ± bedeutet: In der Kultur noch angegangen, für Mäuse nicht mehr pathogen.

Diese Versuche wurden über einen längeren Zeitraum ausgedehnt. Die nach 21 Tagen entnommenen Proben ergaben typische Milzbrandkulturen, bei den nach 28 Tagen entnommenen zeigte sich nur ein geringer Kulturbelag, mit dem der Tierversuch angestellt wurde. Dieser lieferte das überraschende Ergebnis, daß die während dieser langen Zeit mit  $\frac{1}{100}$  normalem Sublimat behandelten Milzbrandbazillen ihre Pathogenität voll bewahrt hatten, während die Maus am Leben blieb, die mit dem von der konzentrierteren Sublimatlösung stammenden Bakterienrasen geimpft worden war. Weitere, nach 37 Tagen entnommene Proben zeigten auf der Agarplatte selbst bei längerer Inkubationsdauer keinerlei Wachstum.

## 2. Versuche mit Staphylokokken.

### Versuch 1. (Tabelle VI.)

Sublimatkonzentration	Versuchsdauer		
	3 Stunden	24 Stunden	
$\frac{1}{5}$ n = 2,712 %	+	—	Versuch abge- brochen
$\frac{1}{25}$ n = 0,542 %	+	+	
$\frac{1}{50}$ n = 0,271 %	+	+	
$\frac{1}{100}$ n = 0,135 %	+	+	

### Versuch 2. (Tabelle VII.)

Sublimatkonzentration	Versuchsdauer			
	1 Tag	2 Tage	3 Tage	4 Tage
$\frac{1}{10}$ n = 0,271 %	+	+	+	—
$\frac{1}{100}$ n = 0,135 %	+	—	—	—
$\frac{1}{100}$ n = 0,027 %	+	+	—	—
$\frac{1}{1000}$ n = 0,013 %	+	+	+	—

Es ergibt sich aus diesen Versuchen, daß wir bei Einhaltung der Ottolenghischen Technik seine Resultate im allgemeinen bestätigen konnten; die Verwendung eines großen Ueberschusses von Schwefelwasserstoff bei verdünnten Sublimatlösungen ist unbedingt notwendig, wie aus den abweichenden Resultaten unserer früheren und jetzigen Versuche hervorgeht. Nach unserer Meinung beruht dies auf einer Adsorptionswirkung. Es ist bekannt, daß fein verteilte organische Substanzen Schwermetallsalze in größeren Mengen adsorbieren; es ist dies sowohl für nicht organisierte Substanzen wie Blutkohle z. B. von Morawitz<sup>1)</sup>, als auch für lebende Zellen von Herzog und Betzel<sup>2)</sup> beobachtet worden. Um nun die verschiedenen Resultate zu erklären, kann man annehmen, daß das Protoplasma der Bakterienzelle eine bestimmte Menge Quecksilbersalze zu adsorbieren vermag und daß diese Adsorption in schwächeren Lösungen einen langsameren Verlauf nimmt als in konzentrierteren; es wird schließlich aus den verdünnten Lösungen eine relativ größere Menge Quecksilber adsorbiert als aus konzentrierten, und zur Entgiftung sind dann entsprechend größere Schwefelwasserstoffmengen notwendig. Diese Annahme steht im Einklang mit denen Bechholds<sup>3)</sup>, der gleichfalls der Adsorption eine wichtige Rolle beim Desinfektionsvorgang zuspricht.

Durch die Untersuchungen von Krönig und Paul ist gezeigt worden, daß durch Zusatz stark elektrolytisch dissoziierter Salze zur Sublimatlösung dessen Wirkung herabgesetzt wird. Diese Verminderung der Wirkung steigt mit der Zugabe des Elektrolyten und tritt bei konzentrierteren Lösungen deutlicher zutage als bei verdünnten. Da das Sublimat in der Praxis meist in Form der Angererschen Pastillen, die aus gleichen Gewichtsteilen Sublimat und Kochsalz bestehen, verwendet wird, so hielten wir es auch für angebracht, Sublimatkochsalzlösungen auf ihre desinfizierende Wirkung zu prüfen. Wir verwendeten pro 1 Molekül Sublimat 1,3 und 5 Moleküle Kochsalz; die letztere Konzentration ist ein wenig höher als das Gewichtsverhältnis 1:1 der Angererschen Pastillen. Ottolenghi verwendete bei einer Versuchsreihe  $\frac{1}{5}$  normale Sublimatlösung und Kochsalz im Verhältnis 1:1, resp. 1:2 und fand eine Verzögerung der Wirkung des Sublimats.

Die Resultate unserer Versuche sind in den nachstehenden Tabellen aufgeführt.

<sup>1)</sup> H. Morawitz, Kolloidchemische Beihefte 1910, Bd. 1, S. 301. — <sup>2)</sup> Herzog und Betzel, Zeitschrift für physiologische Chemie 1910, Bd. 67, S. 309. — <sup>3)</sup> H. Bechhold, Zeitschrift für Chemie und Ind. der Kolloide 1909, Bd. 5, S. 22.

### Versuch 3. (Tabelle VIII.)

Testmaterial: Staph. pyog. aur.

Sublimatkonzentr.	Kochsalzkonz.	Ergebnis
$\frac{1}{10}$ n = 1,356 %	—	Abtötung nach 24 Stunden
$\frac{1}{10}$ n = 1,356 %	1 Mol.	Nach 24 Stunden noch nicht abgetötet
$\frac{1}{10}$ n = 1,356 %	5 "	" 5 Tagen "
$\frac{1}{50}$ n = 0,271 %	—	" 4 " "
$\frac{1}{50}$ n = 0,271 %	1 "	" 4 " "
$\frac{1}{50}$ n = 0,271 %	3 "	" 4 " "
$\frac{1}{50}$ n = 0,271 %	5 "	" 4 " "

Dieser orientierende Versuch war nicht länger beobachtet worden

### Versuch 4. (Tabelle IX.)

Testmaterial: Staph. pyog. aur.

Sublimatkonzentr.	Kochsalzkonz.	Ergebnis
$\frac{1}{10}$ n = 1,356 %	—	Abgetötet nach 4 Tagen, (vorher nicht geprüft)
$\frac{1}{10}$ n = 1,356 %	1 Mol.	" " 6 "
$\frac{1}{10}$ n = 1,356 %	3 "	" " 4 "
$\frac{1}{10}$ n = 1,356 %	5 "	" " 6 "

### Versuch 5. (Tabelle X.)

Testmaterial: Staph. pyog. aur.

Sublimatkonzentr.	Kochsalzkonz.	Ergebnis
$\frac{1}{10}$ n = 1,356 %	—	Abtötung nach 24 Stunden
$\frac{1}{10}$ n = 1,356 %	1 Mol.	" " 24 "
$\frac{1}{10}$ n = 1,356 %	3 "	" " 3 Tagen "
$\frac{1}{10}$ n = 1,356 %	5 "	" " 3 "

Es geht daraus hervor, daß in Uebereinstimmung mit den vorgenannten Autoren eine Verminderung der Desinfektionswirkung des Sublimats durch den Kochsalzzusatz in allen untersuchten Fällen zu verzeichnen ist. Diese kommt insbesondere bei den hochprozentigen Lösungen zur Geltung. Dies geht so weit, daß die Desinfektionskraft der konzentrierteren Sublimatlösung durch Kochsalz derart zurückgedrängt wird, daß dieses Gemisch schwächer wirkt als eine fünffach schwächere Sublimatlösung mit dem gleichen relativen Kochsalzgehalt.

Hieraus kann man für die Praxis schließen, daß man bei Anwendung der Angererschen Pastillen keine Beschleunigung der Abtötung erzielen kann, wenn man konzentriertere Lösungen herstellt.

Der Vollständigkeit wegen unternahmen wir einen analogen Versuch mit Milzbrandsporen, der ein positives Resultat insofern nicht ergab, als ja diese von reinen Sublimatlösungen während praktisch in Frage kommender Versuchszeiten auch nicht abgetötet werden.

## B. Versuche mit Sublimat und Sublamin.

Nachdem die Ottolenghische Methode sich durch die Versuche mit Sublimatlösungen als brauchbar erwiesen hatte, dehnten wir sie auf andere quecksilberhaltige Desinfektionsmittel aus; es seien zunächst die mit Sublamin erhaltenen Resultate mitgeteilt.

Das von der Firma Chemische Fabrik auf Aktien vormals E. Schering in den Handel gebrachte Sublamin ist Quecksilberäthyliden-sulfat mit einem Gehalt von etwa 44 % Quecksilber. Es wird häufig an Stelle des Sublimats angewendet, weil es nicht wie dieses Eiweißverbindungen ausfällt und auch wesentlich ungiftiger ist. Unseren Vergleichsuntersuchungen legten wir den Quecksilbergehalt beider Verbindungen zugrunde. Wir verstehen in den folgenden Mitteilungen z. B. unter  $\frac{1}{10}$  normaler Sublaminlösung eine Lösung, die den gleichen Gehalt an Quecksilber hat wie eine  $\frac{1}{10}$  normale Sublimatlösung, also 10 g im Liter = 1 %.

Die Methodik war dieselbe wie bei den früher beschriebenen Versuchen. (Siehe Tabelle XI, S. 1787.)

Hieraus ergibt sich, daß in höheren Konzentrationen die Wirkung des Sublimats wesentlich stärker ist als die der entsprechenden Sublaminlösungen. Z. B. hat die  $\frac{1}{5}$  normale Sublimatlösung nach drei Stunden, die Sublaminlösung mit gleichem Quecksilbergehalt erst nach zwei Tagen abgetötet. Bei niedrigeren Konzentrationen kommt dieser Gegensatz in geringerem Maße zur Geltung. In der Praxis verwendet man aber bekanntlich das Sublimat mit Kochsalz gemischt. Wir haben in den vorhergehenden Versuchen gesehen, daß gerade bei den starken Konzentrationen dieser Kochsalzzusatz

