[Aus dem hygienischen Institut der Universität Utrecht.]
(Director: Prof. Dr. C. Eijkman.)

Ueber das Absterben von Bakterien beim Kochen unter erniedrigtem Druck.

Von

Dr. J. Schut jr.

(Hierzu Taf. V.)

I. Einleitung.

Beim Gebrauch von Desinfectionsöfen mit strömendem Wasserdampf wird gewöhnlich stillschweigend angenommen, dass man es mit Dampf von 100° C. zu thun hat. Weder Koch, dessen Dampfkochtopf das Laboratoriummodell für all dergleichen Oefen gewesen ist, noch diejenigen, die dessen Idee auf die Desinfectionspraxis anwendeten, haben jemals die Frage gestellt, ob es einen nennenswerthen Unterschied hinsichtlich der Schnelligkeit der Desinfection mache, ob das Wasser gerade bei 100° oder bei etwas niedrigerer Temperatur koche. Man pflegt z. B. beim Gebrauch jener Oefen den Barometerstand nicht in Betracht zu ziehen und wahrscheinlich mit Recht, weil nicht einzusehen ist, wie eine Differenz von etwa einem Grade oder von einer Fraction eines Grades im Siedepunkt einen nennenswerthen Einfluss haben könnte.

Eine ähnliche Frage erhebt sich beim Gebrauch von Desinfectionsöfen an Orten, die ansehnlich über dem Meeresniveau gelegen sind; auch dort sinkt der Siedepunkt des Wassers unter 100° C.

In seinem Jahresbericht des Laboratoriums für pathologische Anatomie und Bakteriologie in Weltevreden 1889¹ hat Dr. Eijkman fürs erste die

¹ *Geneesk. tijdschr. v. Ned. Indie.* 1890. XXX.

Aufmerksamkeit darauf gelenkt. Es hatte sich nämlich ergeben, dass ein Desinfectionsofen in Willem I (Java, 400^m über dem Meere) den gestellten Anforderungen nicht entsprach. In einer Fussnote auf Seite 368 sagt er diesbezüglich: „Wegen der hohen Lage von Willem I liegt der Siedepunkt des Wassers dort unter 100° C. Inwiefern dieser Umstand einen nachtheiligen Einfluss auf das Desinfectirungsvermögen des strömenden Wasserdampfes hat, ist noch nicht untersucht worden. Es wird indessen rathsam sein, bei der Wahl eines Desinfectionsofens darauf zu achten.“

Bis vor Kurzem hatte man diese Frage jedoch nicht experimentell in Angriff genommen, als Rubner¹ umfassende Experimente über die desinfectirende Kraft des gesättigten und des übersättigten Dampfes sowohl über als unter 100° C. anstellte. Ich komme hierauf später zurück. Auch meine Untersuchungen hatten die Frage zum Ausgangspunkt, inwiefern die desinfectirende Kraft des gesättigten Dampfes mit der Temperatur unter 100° C. abnehme. Doch im Anschluss daran habe ich den Einfluss von Temperaturen unter 100° C. auf in Flüssigkeit suspendirte Bakterien einer vergleichenden Untersuchung unterzogen und zwar mit Bezug auf die Frage, ob ein Unterschied bestehe, je nachdem die Flüssigkeit bei der gegebenen Temperatur kocht (bei niedrigem Druck) oder bloss erhitzt wird (bei atmosphärischem Druck).

Was das Kochen anbelangt, dachte ich hierbei vor Allem an eine möglicherweise schädliche Wirkung der Dampfblasen. Es war festzustellen, ob das Kochen der Flüssigkeit einen nachtheiligeren Einfluss hat, als blosses Erhitzen auf dieselbe Temperatur. Ein etwaiger Unterschied müsste am besten dadurch zu erkennen sein, dass für verschiedene Temperaturen die Schnelligkeit des Absterbens beim Kochen und beim blossen Erwärmen mit einander verglichen wurden.

Dafür musste eine Vorrichtung ersonnen werden, die nicht nur das Kochen einer Flüssigkeit bei jedem erwünschten Druck, niedriger als der atmosphärische, ermöglichte, sondern ausserdem erlaubte dann und wann eine Probe des infectirten Materiales zu entnehmen, ohne dass hierbei der Druck durch zuströmende Luft sich erhob. Und daneben musste eine Bakteriensuspension bei derselben Temperatur aber unter atmosphärischen Druck erhitzt werden.

In Abweichung meines ursprünglichen Planes werde ich also nach einander behandeln: das Kochen und Erwärmen bei Temperaturen unter 100° C., und darnach den Einfluss gesättigten Dampfes, gleichfalls unter 100° C., auf die Mikroben besprechen.

¹ *Hygienische Rundschau*. 1899.

II. Kochen bei erniedrigtem Druck im Vergleich mit blosser Erhitzung.

Methode der Untersuchung.

Eine emailirte, metallene Flasche *B*, von ca. 1 Liter Inhalt, ist mit einem Kautschukstöpsel, worin vier Durchbohrungen angebracht sind, luftdicht geschlossen. (Siehe Tafel V).

In der einen Oeffnung steckt ein Thermometer *t*, die zweite enthält ein Glasrohr *d*, welches zu einem Rückflusskühler führt, wodurch Menge und Concentration der kochenden Flüssigkeit in der Flasche constant erhalten werden. Das andere Ende des Rückflusskühlers steht vermittels eines T-Stückes mit einer Wasserstrahlluftpumpe, andererseits mit dem Manometer *C* in Verbindung.

Weil der Apparat auf die Dauer kaum absolut luftdicht zu erhalten ist, und schon ein winziges Leck bei dem relativ geringen Inhalt der Flasche, namentlich bei stark vermindertem Druck, eine fortwährende schnelle Druckerhöhung zur Folge haben würde, war zwischen Kühler und Luftpumpe noch ein T-Stück eingeschaltet, dessen dritter Arm zu einem Luftreservoir führte.

Als solches diente eine bekleidete Flasche von ca. 60 Liter Inhalt. Die immerhin relativ kleinen Luftmengen, welche durch nicht vollkommenes Schliessen hereinkämen, vertheilen sich über diesen grossen Inhalt und geben nur eine äusserst langsame Drucksteigerung, welche sehr leicht aufgehoben werden kann, indem man dann und wann die Luftpumpe in Thätigkeit setzt. Auf diese Weise gelang es, den Inhalt der Flasche *B* bei jeder gewünschten Temperatur (unter 100° C.) kochen zu lassen und sehr genau auf dieser Temperatur zu erhalten.

(Absichtlich wurde die Flasche bekleidet, da alsdann etwaige Veränderungen der Zimmertemperatur weniger Einfluss auf den Druck der darin sich befindenden Luft ausüben.)

Durch die dritte Oeffnung im Kautschukstöpsel steckt ein weites Metallrohr, worin ein Hahn *K* angebracht ist. Das obere Ende des Rohres ist mit einem Kautschukschlauch *m* von ungefähr 5^{cm} Länge versehen.

In der vierten Oeffnung hängt ein Probierröhrchen *r*, dessen unteres Ende bis nahe an den Boden der Flasche *B* heranreicht. Die letztere steht bis zum Halse in einem Wasserbade mit constantem Niveau, das mit einem gut schliessenden Deckel versehen ist; der Dampf des Bades findet durch die Abföhröhre *a* einen Ausweg.

Namentlich bei Experimenten, wo die Temperatur in der Flasche 95 bis 100° C. betrug, musste das Wasserbad so hoch erwärmt werden, dass der Dampf ohne diese Abföhrung sehr hinderlich gewesen wäre.

Beim Anfang eines Experimentes wird zunächst der Luftdruck in der ganzen Vorrichtung so weit herabgesetzt, bis er der Temperatur entspricht, bei welcher ich zu arbeiten beabsichtige. — Inzwischen ist das Wasserbad erhitzt worden, und wenn der aus physiologischer Kochsalzlösung bestehende Inhalt der Flasche *B* die gewünschte Temperatur erreicht hat, fängt derselbe zu kochen an. Ein auf dem Boden befindliches Glasstückchen lässt durch sein fortwährendes Ticken erkennen, dass die Flüssigkeit kocht; übrigens ist das auch am Zurückfließen des condensirten Dampfes aus dem Kühler zu bemerken.

Alsdann wird durch den Kautschukschlauch *m* hindurch ein kleines, mit Bouilloncultur der zu untersuchenden Mikroben gefülltes Probierröhrchen auf den Stöpsel des Hahnes *K* gestellt.

Indem man mittlerweile mit dem Finger den Schlauch oben abschliesst, wird der Hahn geöffnet, das Röhrchen fällt in die kochende Flüssigkeit und giebt beim Anschlagen auf den Boden genau den Zeitpunkt an, wann die Flüssigkeit inficirt wird. Zuvor hatte ich mich, indem ich ein derartiges mit Methylenblau gefülltes Röhrchen in einen mit kochendem Wasser gefüllten Kolben hatte fallen lassen, davon überzeugt, dass der Inhalt sich unmittelbar in das Wasser vertheilte.

Um jedes Mal aus der bei erniedrigtem Druck kochenden Flüssigkeit unter Abschluss der Aussenluft eine Probe entnehmen zu können, bediente ich mich eines mit einer Platinspirale armirten Glasstabes *s*, von der Dicke, dass er gerade in den Kautschukschlauch *m* hineinpasste. (Siehe *K₁₇*) Die Spirale kann eine Flüssigkeitsmenge von ca. 10^{mm} enthalten. Der Kautschukschlauch und der Hahn wurden ziemlich weit genommen, von ca. 1^{cm} Durchmesser, damit ein dicker Stab hindurchgehe. Es wurde dadurch die Gefahr vermieden, dass der Platindraht bei dem Ein- und Ausführen die innere Wandung des Rohres durch Hin- und Herbewegen inficiren könnte.

Zur Entnahme einer Probe führte ich den vorgewärmten und eingefetteten Stab in den Kautschukschlauch hinein, bis dieser sich gut um ihn schloss; dabei wurde Acht darauf gegeben, dass die Spirale den Stöpsel des Hahnes nicht berührte; alsdann konnte ich den Hahn aufdrehen, ohne dass Luft zutrat, und der Stab wurde in das Gefäss gesenkt, bis ein ihn umschliessender Kautschukring den Schlauch berührte; eine vorhergehende Sondirung hatte mich belehrt, dass die Spirale sich dann gerade in der Flüssigkeit befand, das untere Ende des Stabes jedoch noch nicht.

Darnach wurde er aufgezogen, bis der Platindraht wieder über dem Hahne war, was ich durch das Ansaugen des Schlauches fühlen konnte. Hätte man jetzt den Hahn schliessen und den Stab dann weiter heraus-

ziehen wollen, so würde der Kautschukschlauch gegen die beladene Spirale angesaugt und inficirt worden sein. Diesem wurde jedoch durch zwei kleine Löcher *o* und *g*, die in den Hahn gebohrt waren, wie Figur *K₁* an giebt, vorgebeugt. Schloss man den Hahn jetzt, so trat die Luft in den Raum *h* zwischen dem Hahne und dem Stabe, und die Spirale konnte nun unbehindert ganz herausgezogen werden.

Die Kochsalzlösung in dem Reagensglase *r* wurde mit einer Platinöse mit Cultur inficirt. Sie hatte, wie ich wiederholt feststellen konnte, bis auf eine kleine Fraction eines Grades dieselbe Temperatur wie der Inhalt der Flasche; auf diese Weise konnten also (vorbehaltlich der kleinen Temperaturdifferenz, welche, wie die Resultate erwiesen, vernachlässigt werden konnte), die Experimente mit Kochen und mit blossem Erhitzen stets zu gleicher Zeit und vollkommen unter denselben Umständen gemacht werden. Die Platinöse, womit die Proben entnommen wurden, war am Ende eines Glasstabes eingeschmolzen, welcher genau in das Reagensglas hineinpasste. Hierdurch würde wiederum verhütet, dass die Oese die Wandung beim Herausziehen berührte. Obgleich ich fast immer mit leicht zu erkennenden Bakterien operirte, versteht es sich doch, dass accidentelle Infectionen möglichst vermieden wurden. Nicht nur die Platinösen, sondern auch die Glasstäbe wurden vor jeder Probeentnahme gehörig flambirt; zum Einschimieren wurde nur sterilisirtes Fett benutzt. Die Flasche mit den zugehörigen Theilen wurde vor jedem Versuch während einer Viertelstunde im Autoclav auf 115° C. erhitzt. Schon vorher war die erforderliche Flüssigkeitsmenge hineingethan, so dass diese zugleich noch einmal sterilisirt wurde. Hierdurch gelang es so gut wie jede Verunreinigung auszuschliessen.

Des Weiteren ist es noch von grossem Belang, dass die Flasche wenig Flüssigkeit enthält, denn gösse man zu viel hinein, so würden die Tropfen in den Kühler spritzen und nach einiger Zeit abgekühlt in die Flasche zurückfallen, was mir im Anfang mehrmals passirte. Schliesslich ist es aus gleichem Grunde noch empfehlenswerth, den Hals der Flasche durch Bekleidung mit einem, die Wärme isolirenden Stoff gegen Abkühlung zu schützen.

Anfangs wurde jede Probe in Nährbouillon geimpft, aber bald ergab sich, dass diese Methode weniger genau ist. Wie schon vorausszusehen war, und sich auch bei unseren Versuchen herausstellte, sterben nicht alle eingebrachten Keime in gleicher Zeit ab; viele sind schon ziemlich bald todt, andere halten es länger aus, während einzelne vielleicht nur ein oder zwei auf einer Platinöse sich viel widerstandsfähiger zeigen. Impft man nun in Nährbouillon, so wird man an den daraus erhaltenen

Culturen die successive Abnahme der Keimenzahl nicht ersehen können, die einzelnen hartnäckigen werden die Bouillon eben so sehr trüben oder färben, während es zu unserem Zwecke doch besser ist, diese vereinzelt Keime nicht in Rechnung zu ziehen.

Sterilisierungsversuche, wobei man nicht quantitativ arbeitet, sind also als minderwerthig zu betrachten, und die hierbei angegebenen Zeiten sind durchgängig zu lang.

Bei meinen Experimenten wendete ich deshalb immer die Plattencultur an, und zwar in Form von Rollröhrchen, Anfangs mit Gelatine, später mit Agar-Agar. Diese Rollröhrchen hatten für uns mehrere Vortheile über jene aus Gelatine, erstens bei den Experimenten mit Bakterien, welche die Gelatine verflüssigen, was das quantitative Arbeiten sehr beschwerlich macht; dazu kommt, dass die Anfertigung von Agarrollröhrchen viel weniger Zeit erfordert. Auch ist damit möglich, bei 37° C. zu cultiviren, was, namentlich wenn es sich um pathogene Keime handelt, ein grosser Vortheil ist. Auch braucht man weniger lange auf die Resultate zu warten, was für eine ununterbrochene Fortführung der Versuche nicht ohne Belang ist. — Man kann das Agar-Agar vor der Impfung bis nahe an 40° C. abkühlen lassen, ohne dass es gerinnt, und diese Temperatur ist für alle von mir untersuchten Mikroben unschädlich, wenigstens während der kurzen Frist, die zum Rollen nöthig ist.

Zum Schluss noch ein Vortheil der Plattencultur über die Bouillonculturen. Es wird dadurch zugleich ermöglicht, individuelle Abweichungen der Colonieen wahrzunehmen, wie z. B. verzögertes Eintreten oder gänzlichliches Ausbleiben der Fluorescenz bei *Bac. fluorescens*, das Auftreten der weissen Varietät des *Bacillus prodigiosus*, Abweichungen, welche bei Cultur in Bouillon verborgen bleiben können.

Es ist empfehlenswerth, die Agar-Agarrollröhrchen umgekehrt in den Brutofen zu stellen, damit das Expressionswasser in den Wattepropf aufgesogen wird, sonst läuft es auf den Boden zusammen und behindert dort die getrennte Entwicklung und damit das Zählen der Colonieen. Auch ist es besser, anstatt 1.5 Procent Agar-Agar etwas mehr, bis zu 2 Procent zu nehmen, damit man eine consistentere und adhärentere Schicht bekommt.

Unsere vergleichenden Untersuchungen über den Einfluss des Kochens und des einfachen Erhitzens sind sowohl mit vegetativen Bakterienformen als mit Sporen angestellt worden. Was die ersteren anbetrifft, so wurde dazu stets eine ungefähr 24 Stunden alte, in physiologischer Kochsalzlösung vertheilte Bouilloncultur benutzt. Absichtlich wurden Culturen von nicht mehr als 24 Stunden Alter gewählt. Aus den Untersuchungen u. A.

von Hehewerth¹ geht hervor, dass in jedem Nährmedium die Anzahl lebendiger Keime nach Verlauf einer bestimmten Zeit beständig abnimmt, diese Verminderung hängt an erster Stelle von den Ernährungsbedingungen ab, dann aber auch zeigen die Mikrobenspecies unter sich erhebliche Differenzen in dieser Beziehung. Für Culturen von *Bac. coli* in Bouillon bei 37° C. fand Hehewerth, dass zwischen 24 und 29 Stunden eine grosse Anzahl abstirbt. In solchen Culturen hat man aber neben noch vollständig lebensfrischen und schon abgestorbenen Keimen naturgemäss auch deren viele, die im Begriff stehen, abzusterben; diese werden natürlich jeder schädlichen Wirkung gegenüber weniger resistent sein.

Um also in jeder Hinsicht vergleichbare Ergebnisse zu bekommen, wurde die Cultur stets ungefähr gleich alt und zwar von 20 bis 24 Stunden Alter genommen.

Für jede Mikrobenspecies wurde bei verschiedenen Temperaturen der Zeitverlauf, wonach die Keime abgestorben waren, bestimmt. Im Nachfolgenden sind die Versuchsergebnisse graphisch wiedergegeben, und zwar wurden die Zeiten als Abscissen, die Temperaturen als Ordinaten aufgetragen.

Bei einer Versuchsreihe von mittlerer Zeitdauer (20 bis 40 Minuten) wurde in der Regel jede 5 Minuten eine Probe genommen, währte sie länger, so geschah das jede 10 bis 15 Minuten, bei kürzerer Dauer wählte ich kürzere Intervalle (z. B. 1, 3, 6, 9 Minuten oder 1, 4, 8, 12 Minuten).

Zuvor war in einzelnen orientirenden Versuchen die ungefähre Zeitdauer des Absterbens bei zwei oder drei auseinanderliegenden Temperaturen festgestellt worden.

Man erhielt also jedes Mal eine Serie Rollröhrchen, wovon die ersteren Nummern mehr oder weniger zahlreiche Colonieen zeigten, die letzteren steril waren.

Erhielt man z. B. nach 20 Minuten noch eine Anzahl von Colonieen, nach 25 Minuten keine einzige mehr, so wurde die Curve mitten zwischen beide Zeiten hindurchgezogen. Es geschah auch mehrmals, dass nach Verlauf einer bestimmten Zeit Kochens oder Erhitzens nur noch ein oder zwei Colonieen aufkamen, während die vorhergehende Nummer deren noch viele enthielt; in diesem Falle nahm ich als Zeit des Absterbens den Augenblick an, wo die betreffende Probe genommen war.

Weil es aber von einem praktischen Standpunkte aus von Belang war, die Bakterien auch in anderen Substraten als in Salzlösung zu untersuchen, habe ich gleichfalls Experimente mit frischer Milch, und für Wasserbakterien mit gewöhnlichem Wasser gemacht.

¹ *Archiv für Hygiene*. Bd. XXXIX.

Ich habe, da es mir darum zu thun war, den in der Praxis in Betracht kommenden Verhältnissen möglichst nahe zu kommen, die Milch nicht zuvor sterilisirt, in Anbetracht der dadurch eintretenden physischen und chemischen Veränderungen.

Was die Auswahl der Versuchsmikroben anbetrifft, so wurden als Vertreter der Saprophyten die leicht erkennbaren *Bac. prodigiosus* und *Bac. fluorescens liquefaciens* auserkoren; von den parasitischen wählte ich *Bac. pyocyaneus*, *coli*, *typhi*; von den sporenbildenden den *Bac. anthracis*. Schliesslich machte ich, wie schon erwähnt, noch einige Experimente mit Bakteriengemischen in ihrem natürlichen Milieu: Milch und Grabenwasser.

Resultate.

Bacillus fluorescens liquefaciens.

Dieser darf als Typus eines Saprophyten gelten. Er wächst nicht mehr bei einer Temperatur über 30° C. und wurde für unsere Experimente bei 22° C. gezüchtet. Die nachfolgenden Ergebnisse beziehen sich auf in Kochsalzlösung geimpfte Bouilloncultur.

Temperatur	Zeitdauer des Absterbens	
	Kochen	Erwärmen
55° C.	< 1 Minute	< 1 Minute
53° „	< 1 „	< 1 „
52° „	< 1 „	< 1 „
50° „	2 „	5 „
48° „	2 „	10 „
46° „	1—4 „	10—15 „
45° „	1—4 „	15—20 „
43° „	1—4 „	20—25 „
41° „	2—5 „	25—30 „
40° „	5—10 „	30—35 „
38° „	15—20 „	35—45 „
35° „	20—30 „	Keine Verminderung
33° „	> 1 Stunde	„ „

Bei graphischer Wiedergabe obiger Zahlen bekommt man die nachstehenden Curven. (Siehe Fig. 1.)

Von allen von mir untersuchten Mikroorganismen ist dieser am wenigsten widerstandsfähig gegen Hitze. Bei einer Temperatur von 41° C. stirbt er durch Kochen schon innerhalb 5 Minuten, ohne Kochen aber nach einer halben Stunde. Bei 52° C. wird er in beiden Fällen innerhalb einer Minute abgetödtet.

Dem Absterben geht eine Periode voraus, in welcher die Bacillen grösstentheils noch leben, aber das Vermögen der Fluorescenz schon eingebüsst haben; bei einer Temperatur von 38° C. geschieht das durch blosses Erhitzen nach ca. 20 Minuten, bei Kochen schon nach 5 bis 10 Minuten. Den grössten Unterschied zwischen Kochen und Erhitzen fand ich bei etwa 40° C. und darunter.

Fig. 1.

Ohne Kochen war bei 35° C. auch nach 2 Stunden keine Verminderung in der Zahl lebensfähiger Keime zu bemerken, während sie durch Kochen bei dieser Temperatur schon in 20 bis 30 Minuten abgetötet wurden. Bei 33° C. musste dieser Zeitraum schon bis zu mehr als einer Stunde verlängert werden.

Bacillus prodigiosus.

Einer Erhitzung (ohne Kochen) über 50° C. widerstand der *Bacillus prodigiosus* nicht länger als 5 Minuten, und bei 51° C. starb er schon in einer Minute. Bei 48½° C. wurde jene Zeit schon bis zu 10 Minuten verlängert.

Bei Erwärmung auf 41° C. bemerkte man nach zwei Stunden noch keine Verminderung in der Keimzahl, während beim Kochen der Tod alsdann schon innerhalb 40 Minuten eintritt. Bei Temperaturen unter 40° C. wird in einer kochenden Flüssigkeit mehr als eine Stunde erfordert, ehe die letzten Keime absterben.

Bei Erhitzung mit oder ohne Kochen auf Temperaturen zwischen 43° und 48° C. sieht man in ziemlich kurzer Zeit, ungefähr 5 Minuten, den grössten Theil der Keime schon erliegen; die überbleibenden entwickeln sich zu Colonien, welche alle verschiedene Nuancen von roth bis

weiss zeigen. Die weissen Colonieen kommen später als die rothen zum Vorschein, meistens erst nach 4 bis 5 Tagen im Brütöfen bei 22° C.

Weiter fand ich die Eigenthümlichkeit, dass die in Bouillon bei 22° C. cultivirten Bacillen dem Erhitzen und dem Kochen gegenüber resistenter waren, als wenn sie bei 37° C. gewachsen waren:

Temp. 46° C. Gezüchtet bei 22° C.				Mit Kochen 10 Minuten	Ohne Kochen 25 Minuten
			37°	4	15
"	48°	"	22°	5	15
		"	37°	1	5

Fig. 2.

In Milch suspendirt, zeigen die Keime sich wiederum widerstandsfähiger als in Kochsalzlösung und zwar:

Temp. 46° C.		Mit Kochen	Ohne Kochen
{	Milch	25 Minuten	45 Minuten
	0.9 NaCl	10 "	25 "

Bacillus pyocyaneus.

Wie abweichend die Resultate verschiedener Forscher sein können, zeigt die Vergleichung der Erwärmungscurve meines Bac. pyocyaneus mit einzelnen Angaben von Emmerich und Löw.¹ Sie konnten den Bacillus pyocyaneus $\frac{3}{4}$ Stunde bei 100° C. und $1\frac{1}{4}$ Stunde bei 85° bis 90° C. erhitzen, ohne dass er seine Lebensfähigkeit verlor.

Eine Cultur dieses Bacillus wurde durch einen Berkefeldfilter gepresst, dann während $\frac{3}{4}$ Stunde in ein kochendes Wasserbad gestellt, darnach in

¹ Diese Zeitschrift. 1899.

Agar-Agar geimpft. Schon am folgenden Tage trat eine intensiv grüngefärbte Cultur von *Bac. pyocyaneus* auf. Sie selbst sind augenscheinlich über dieses Resultat erstaunt: „Es ist immerhin möglich, dass der *Bacillus pyocyaneus* bis jetzt nicht nachgewiesene Sporen bildet, welche so klein sind, dass sie durch Berkefeldfilter hindurchgehen.“

Meine Cultur bildete ganz gewiss keine Sporen; bei einer Temperatur von 53° C. stirbt sie schon innerhalb einer Minute, sowohl durch Kochen wie durch einfaches Erhitzen.

Bei einer Temperatur von 45° C. ohne Kochen ist der *Bacillus pyocyaneus* noch im Stande, sich zu vermehren, die kochende Flüssigkeit tötet ihn dann schon in ungefähr 30 Minuten. Bei noch niedriger Temperatur wird viel längeres Kochen erfordert, bei 40° C. ungefähr 3 Stunden, während bei 37° C., dem Temperaturoptimum, erst nach 7 Stunden die letzten Keime getötet sind.

Fig. 3.

Im Gegensatz zu *Bac. prodigiosus* und *Bac. fluorescens* verlor der *Bac. pyocyaneus* nie sein farbeproducirendes Vermögen. Bei 22° C. gewachsene Culturen zeigten in Abweichung vom mehr saprophytischen *Prodigiosus* geringere Resistenz als die bei 37° C. erhaltenen; jedoch stimmen die beiden insoweit überein, dass sie am längsten Widerstand leisten, wenn sie bei der ihrer Natur am meisten entsprechenden Temperatur cultivirt wurden.

	Temperatur	Mit Kochen	Ohne Kochen
Cultivirt bei 37° C.	49° C.	5—10 Min.	15—20 Min.
	47° „	15—20 „	30—40 „
„ „ 22° „	49° „	5 „	10—15 „
	47° „	5—10 „	15—20 „

In hohem Maasse zeigen sich die Ergebnisse von der Natur des Mediums beeinflusst, wie die nachfolgenden Ziffern lehren:

Temp. 53° C.	In Milch	Mit Kochen	Ohne Kochen
		20 Min.	30 Min.
„ 50° „	„ 0.9 NaCl	< 1 „	< 1 „
	In Milch	> 1 Stunde	> 1 Stunde
	„ 0.9 NaCl	6 Min.	12 Min.

Bacillus typhi und coli.

Auch die mit Bac. typhi und Bac. coli erhaltenen Versuchsergebnisse sind hier graphisch wiedergegeben und glaube ich nach Obigem von einer detaillirten Besprechung der Versuchsergebnisse absehen zu dürfen. Nur

sei darauf hingewiesen, dass auch hier wiederum der beschleunigende Einfluss des Kochens auf das Absterben der Keime deutlich hervortritt und dass *Bac. typhi* sich jeder Temperatur gegenüber sowohl in einer kochenden als in einer bloss erhitzten Salzlösung weniger resistent zeigt als *Bac. coli*.

Bacillus anthracis.

Vom Milzbrandbacillus bestimmte ich nur die Widerstandsfähigkeit der Sporen. Anfänglich bei 18° C. gezüchtet und dann während einiger Tage bei 37° C. verblieben, zeigte die Cultur sich fast ausschliesslich als aus Sporen bestehend. Getrocknet und mit Glaspulver ein wenig zerrieben, stellte dieselbe ein Versuchsmaterial dar, dass sich, wie anzunehmen war, in den 14 Tagen, während welcher die Experimente dauerten, wenig änderte, um so mehr, als es beim Anfang der Versuche schon gut einen Monat alt war.

Fig. 6.

Wie sich aus den Curven ergibt, ertragen auch die Sporen besser das Erhitzen als das Kochen.

Bei einer Temperatur von 97° C. wurden sie in den beiden Fällen schon in einer Minute abgetötet, weiter nach unten weichen die Curven mehr aus einander.

Ohne Kochen scheint eine Temperatur von 83° C. ihnen auch in einer Stunde gar nicht zu schaden; andernfalls muss diese Grenze bei ungefähr 81° C. gezogen werden.

Nebenbei bemerkt, fand ich, dass die Sporen mit dem Altern der Cultur die Hitze besser ertragen, und also gewissermaassen gereift werden. — Für die resistenten Sporen habe ich jedoch die Curve nicht gemacht, aber ich darf auf Grund meiner Experimente aussagen, dass ihre Form der anderen ähnlich ist, nur um einige Grade nach oben verschoben.

Grabenwasser.

Nachdem ich festgestellt hatte, dass die Keime schneller zu Grunde gehen, wenn die Flüssigkeit kocht, als bei blosser Erhitzung; und ich weiter constatirt hatte, dass für jede Bakterienspecies eine Temperatur besteht, wo dieser Unterschied am grössten ist, habe ich versucht, die Temperatur für ein Bakteriengemisch, wie es im Grabenwasser vorkommt, zu finden.

Bei einer Temperatur von 27° C. zeigte sich auch nach 2 Stunden keine Abnahme der Keimenzahl, weder durch Erhitzen, noch durch Kochen. Nach einer Stunde bei 47° C. fand ich in den beiden Fällen den grösseren Theil der Keime schon abgestorben; noch eine Stunde später war durch Erhitzen keine Verminderung mehr aufgetreten, im gekochten Wasser hingegen waren alsdann alle Keime vernichtet.

Das letztere Resultat glaube ich jedoch ausschliesslich dem Umstande zuschreiben zu müssen, dass zufällig in den herausgenommenen Proben keine Sporen oder thermophile Mikroben anwesend waren; sonst wäre es ja undenkbar, dass alle Keime bei 47° C. in 2 Stunden getödtet waren. Denn bekanntlich giebt es Keime, die sogar das Kochen bei 100° C. mehr als 2 Stunden ertragen.

Dass der grössere Theil schon innerhalb einer Stunde abgestorben war, versteht sich leicht; man hat es fast ausschliesslich mit Saprophyten zu thun, die vegetativen Formen werden also diese Erhitzung nicht so lange ertragen (siehe *Bac. fluorescens*), späterhin verminderte sich die Anzahl durch Erwärmen nicht mehr, es sind jetzt die Sporen und die thermophilen Bakterien, die Widerstand leisten.

Meine Vermuthung wurde bei einem folgenden bei 55° C. angestellten Versuche bestätigt. Hieraus ergab sich, dass sowohl durch Kochen wie durch blosses Erhitzen die Keimenzahl in einer halben Stunde schon bis zu einem sehr kleinen Reste reducirt war. Die Ueberbleibenden aber widerstanden noch 2 Stunden fortgesetztem Kochen bei 55° C. Bei der mikroskopischen Untersuchung stellte sich heraus, dass von den aus den übergebliebenen Keimen gewachsenen Colonieen (sechs an der Zahl, während sich in dem Control-Rollröhrchen ungefähr 80 Colonieen entwickelten) vier aus sporenbildenden Bacillen und zwei aus Mikrokokken bestanden.

Milch.

Bei den Kochversuchen zeigte sich eine Schwierigkeit, die Anfangs sehr störend wirkte. Erhitzte ich nämlich die Milch zu der gewünschten Temperatur und brachte sie dann unter erniedrigten Druck, so fing sie dermassen aufzuwallen an, dass der ganze Kühler damit gefüllt wurde; nach ungefähr einer halben Stunde wurde das Kochen ruhiger und floss nur

Condensationswasser aus dem Kühler zurück. Wenn aber später die Temperatur des Wasserbades etwas zu hoch anstieg oder die Luftpumpe einen Augenblick in Arbeit gesetzt werden musste, fing das starke Kochen aufs Neue an.

War die Milch schon inficirt und geriethen also einige Keime in den Kühler, so waren sie zeitweise der Einwirkung des Kochens und der Hitze entzogen, fielen abgekühlt allmählich in die Flasche zurück, und gaben also trüglische Resultate. All diesem konnte ich dadurch zuvorkommen, dass ich schon vor der Erhitzung die Luft in der Flasche unter den gewünschten Druck brachte und Sorge dafür trug, dass das Wasserbad nicht zu heiss wurde.

Mein Zweck mit diesen und den früher schon beschriebenen Experimenten mit *Bac. pyocyaneus* und *prodigiosus* in Milch, war, zu ermitteln, ob man durch Kochen bei möglichst niedriger Temperatur die vegetativen Formen tödten und so dass Pasteurisiren ersetzen könnte. Die Möglichkeit, die Milch ganz keimfrei zu machen, war dabei aus naheliegenden Gründen ausgeschlossen.

Die sich in der Milch befindenden, von den Eutern der Kuh, von den Händen der Milchenden und vom Gefäss herkömmlichen Keime nehmen, auch durch blosses Erhitzen auf etwa 55° C., schon ziemlich bald an Zahl ab, doch ebenso wie bei den Versuchen mit Grabenwasser bleiben deren auch nach mehreren Stunden Erwärmens noch einzelne übrig. Die Rollröhrchen (in diesem Falle giebt Gelatine bessere Resultate als Agar-Agar) können zwar in den ersten Tagen steril erscheinen, stets sieht man aber nach etwa 6 Tagen noch einzelne Colonieen aufkommen. Wenn man aber erwägt, dass *Bac. pyocyaneus* an Resistenz gegen Wärme nicht oder kaum hinter den anderen von mir untersuchten pathogenen Bacillen zurücksteht, und dass er, in Milch auf 53° C. erhitzt, nach 30 Minuten schon abgestorben ist, so ist eine Erhitzung auf 70° C., wie bei dem Pasteurisiren stattfindet, ganz gewiss mehr als hinreichend, um die vegetativen Formen der pathogenen Keime zu tödten.

Vergleicht man Milch, die bei 70° C. während etwa einer Viertelstunde gekocht hat, mit solcher, die gleich lange und gleich hoch in einem offenen Gefäss erwärmt wurde, so zeigt sich ein Unterschied darin, dass in der gekochten Milch keine Spur von Hautbildung stattgefunden hat, es sei denn, dass man unmittelbar nach dem Kochen die Milch in ein offenes Gefäss ausgiesst. Die Hautbildung aber ist, wie neuere Untersuchungen gelehrt haben, insofern von Bedeutung, als die in dem Häutchen eingeschlossenen Keime wegen ihrer geschützten Lage der Wärme länger widerstehen. Aber auch abgesehen davon — denn durch eine geeignete Vorrichtung lässt sich auch bei blosser Erwärmung der Milch die Hautbildung

leicht vermeiden — sterben die Keime in der kochenden Milch schneller ab. Dem gegenüber steht jedoch der Nachtheil, dass, wie wir später sehen werden, das Kochen dem Entstehen einer chemischen Umsetzung in der Milch, nämlich dem Verschwinden der Enzymreaction mit H_2O_2 , Vorschub leistet. Und überdies kann man durch eine nur wenig höhere Erhitzung den gleichen Effect hinsichtlich des Absterbens der Keime in derselben Zeit erreichen als mit dem Kochen.

Meine ursprüngliche Erwartung, dass das Kochen bei erniedrigtem Druck in der Praxis das Pasteurisiren mit Vorthail ersetzen könnte, ist mithin nicht erfüllt worden.

Zusammenfassung.

Wie schon zu erwarten war, stellte sich bei meinen Untersuchungen ein grosser Unterschied in der Widerstandsfähigkeit gegen Wärme zwischen Saprophyten und Parasiten heraus. Ausserdem zeigen diese beiden Kategorieen auch unter sich ziemlich aus einander gehende Temperatur-Curven des Absterbens, besonders was die absolute Höhe betrifft.

Und auch für dieselbe Bakterien-species fand ich verschiedene Resistenz abhängig vom Medium, worin die Keime suspendirt, von der Temperatur, wobei sie gezüchtet waren, und vom Alter der Cultur, woraus das Material entnommen war. In Milch widerstanden die Mikroben der Wärme viel länger als in einer Kochsalzlösung; *Bacillus prodigiosus* und *pyocyaneus* zeigten sich am meisten resistent, wenn sie bei ihrem Temperaturoptimum cultivirt waren; die aus einer jungen Cultur entnommenen Milzbrandsporen starben viel eher, als wenn die Cultur einige Wochen alt war.

Schliesslich bestehen bedeutende individuelle Differenzen, wie insonderheit bei den Kochversuchen deutlich zu ersehen war; in einem Viertel der zur Vernichtung aller Keime benötigten Zeit waren deren schon etwa 90 Procent abgestorben, die Ueberbleibenden zeigten sich viel resistenter. Bei blosser Erwärmung ist dieser Unterschied weniger in die Augen fallend, die Anzahl lebensfähiger Keime nimmt hier gleichmässiger mit der Zeit ab.

Dem Absterben geht eine Periode voran, in welcher die Mikroben noch lebensfähig sind, aber ein verzögertes Wachsthum aufweisen, bei Milzbrandsporen währte es oft mehr als 2 Tage, ehe sich bei 37° C. Colonieen entwickelten, während sie normal schon in 24 Stunden zum Vorschein kamen. Die Saprophyten *Prodigiosus* und *Fluorescens* zeigten bei 22° C. gezüchtet für gewöhnlich nach 2×24 Stunden schon gut sichtbare Colonieen; eine kurze Erhitzung mit oder ohne Kochen verlängerte diese Zeit auf 4 bis 6 Tage.

Während es bei den höheren Temperaturgraden wenig zur Sache thut, ob das Medium koche oder zu demselben Wärmegrad bloss erhitzt werde, weil die Zeiträume zu kurz werden, um noch einen deutlichen Unterschied constatiren zu können, so wird bei niederer Temperatur hingegen der Unterschied sehr in die Augen fallend. Für jede der von mir untersuchten Bakterien besteht eine Temperaturgrenze, wo sie lediglich durch Erhitzung nicht oder erst nach mehreren Stunden getödtet werden, während sie dann durch Kochen schon ziemlich bald absterben.

So gelang es, die vegetativen Formen bei einer Temperatur, wobei sie sich unter gewöhnlichen Umständen noch vermehren können, zu vernichten. Den *Bac. pyocyaneus* konnte ich z. B. sogar bei 37° C. tödten, wenn auch diese Execution 7 Stunden beanspruchte.

Noch deutlicher erhellt der Effect des Kochens aus folgendem modificirten Kochversuch, wobei ausgegangen wurde von der experimentell ermittelten Thatsache, dass in einer Suspension des *Bac. pyocyaneus* in physiologischer Salzlösung nach dreistündigem Kochen bei 40° C. die Keime zum grösseren Theile aber noch nicht alle vernichtet sind. Zunächst wurde das Luftreservoir so weit leer gesogen, dass der Druck einem Siedepunkt von 37° C. entsprach. Dann erhitzte ich die Suspension bis zu 40° C., während das Reservoir ausgeschaltet war. Durch Oeffnen des Hahnes zum Reservoir wurde nun plötzlich der Druck herabgesetzt, und der Inhalt der Flasche fing an stark zu kochen. Nach ein Paar Minuten wurde der Hahn wieder geschlossen und dadurch, dass ich ein wenig Luft in die Flasche *B* hineintreten liess, stieg der Druck und damit die Temperatur wieder empor. Darauf wurde der Druck wieder plötzlich vermindert u. s. w.

Auf diese Weise, durch sehr energisches Kochen also, wobei die Temperatur von 37 bis 40° C. hin und her schwankte, konnte ich den *Bac. pyocyaneus* in 1½ Stunden tödten.

Betrachtet man die auf die vegetativen Formen sich beziehenden Koch- und Erwärmungskurven, so ergibt sich zunächst, dass der Widerstand gegen Erwärmung mit dem Ansteigen der Temperatur regelmässig abnimmt, die Linie ist innerhalb gewisser Grenzen ziemlich gerade. Erst in den höheren Temperaturen weicht die Curve einigermaassen ab; dort hat wegen der immerhin schon kurzen Zeitdauer des Absterbens ein Grad Erhöhung keinen nennenswerthen Einfluss, die Curve geht dort also steiler hinauf. Ein wenig über dem physiologischen Maximum, der oberen Temperaturgrenze, wobei der Mikroorganismus sich noch lebend erhalten kann, giebt ein Grad Erhöhung der Temperatur dagegen einen ziemlich grossen Zeitunterschied; hier hat die Curve also einen mehr horizontalen Verlauf.

Unterziehen wir jetzt die Erwärmungs- und die Kocheurven einer vergleichenden Betrachtung.

Am ausgeprägtesten zeigt sich der Unterschied zwischen Kochen und einfachem Erwärmen in den Curven des *Bac. fluorescens* auf S. 331; bei den übrigen Mikroorganismen ist dieser Unterschied weniger deutlich hervortretend, aber er zeigt sich dennoch im gleichen Sinne.

Das Kochen hat also nicht auf alle Bakterien einen ebenso grossen, möglicherweise sogar nicht einmal denselben Einfluss, stets aber werden sie durch Kochen schneller getötet, als durch blosses Erwärmen bei der gleichen Temperatur. Während die Erwärmungscurve bei allen Bakterien ein wenig über ihrem physiologischen Temperaturmaximum schon eine horizontale Richtung annimmt, sinkt die Kochcurve dann noch deutlich, und erst zwischen Maximum und Optimum ändert sie ihre Richtung, wird jedoch nie ganz horizontal. So weit ich wenigstens ermitteln konnte, gelingt es auch innerhalb der physiologischen Grenzen stets, die Mikroben durch Kochen zu tödten.

Zwar sieht man die beiden Linien bei den höheren Temperaturen, denen die Keime nicht länger als 1 bis 5 Minuten widerstehen können, in unmittelbarer Nähe neben einander verlaufen, ein Unterschied bleibt aber bestehen, stets sterben die Keime am schnellsten beim Kochen.

Betrachten wir schliesslich die Curven der Sporen, so fällt es unmittelbar in die Augen, dass die Kochcurve hier wieder den gleichen Typus darbietet, wie oben, aber dass die Erwärmungscurve, anstatt einen mehr geradlinigen Verlauf zu nehmen, damit in Form fast übereinstimmt. Uebrigens gilt auch für die Sporen wieder, dass sie früher durch Kochen absterben, als durch einfache Erwärmung bei derselben Temperatur.

Hier wäre es am Platze, die Frage zu erörtern, wie die Wirkung des Kochens zu erklären sei; aber bevor ich dazu übergehe, erscheint es mir angebracht, erst die Versuche über Sterilisierung durch Dampf bei niedrigem Druck mitzutheilen.

III. Untersuchungen über die Einwirkung von Wasserdampf bei erniedrigtem Druck.

In „Hygienischer Rundschau“ vom April 1899 sagt Rubner, dass dazumal noch keine entscheidenden Versuche über diesen Gegenstand publicirt waren und hat er deswegen selber ein ausführliches Studium darüber angestellt. Nicht bloss prüfte er die desinficirende Kraft gesättigten Dampfes bei verschiedenen Temperaturen, sowohl unter als über 100° C., sondern auch die des ungesättigten Dampfes und von Mischungen von Dampf und Luft; auch bespricht er die Ursachen des Todes der Mikroben durch Dampfeinwirkung.

Ueber die Wirkung gesättigten Dampfes unter 100° C. auf Milzbrandsporen sagt er: „Die Versuche zeigten, dass Dampf von niederer

Temperatur als 100° C., z. B. 95° C., nur wenig aber immerhin deutlich in seiner Wirksamkeit hinter dem Dampf von 100° C. zurücksteht. Erheblicher werden die Differenzen bei 90° C. Wenn Milzbrandsporen in Dampf von 100° C. in einer Minute absterben, so wirkt Dampf von 90° C. erst in 12 Minuten. Trägt man die Zeiten der Desinfection als Ordinaten, die Temperaturen als Abscissen auf, so erhält man eine Curve, welche unter 95° C. sich ziemlich steil zu 90° C. hebt. Auch bei Sporen einer saprophytischen Art ergaben sich dieselben Verhältnisse.“

Soviel aus seinen Mittheilungen hervorgeht, scheint Rubner nicht quantitativ untersucht zu haben, jedenfalls sind die von ihm als Testobject benutzten Seidenfäden mit angetrockneten Sporen, obschon durch ihre geringe Masse von Vorthail, meiner Meinung nach für derartige Versuche weniger geeignet. Es ist ja unmöglich, alle Keime daraus zu entfernen und in die geschmolzene Nährgallerte zu vertheilen; an der Cultur wird man also nicht ersehen können, ob der Faden noch einen, 10 oder etwa 100 lebensfähige Keime enthält, was doch nicht ohne Belang ist.

Als ich also anlässlich der in der Einleitung gestellten Frage eigene Untersuchungen anstellen wollte über die desinficirende Wirkung gesättigten Dampfes bei Temperaturen unter 100° C., habe ich dabei dem obigen Bedenken durch entsprechende Modificirung des Testobjectes Rechnung getragen. Ueberdies habe ich meinen Apparat so eingerichtet, dass es möglich war, bei jedem Versuch eine Reihe von Proben nach beliebigen Zwischenzeiten zu entnehmen. Rubner's Apparat war dazu an sich nicht geeignet.

Beschreibung des Apparates.

Der Apparat besteht aus einem cylindrischen Metallgefäss, dessen oberer Theil einen stumpfen Winkel (von ca. 135° C.) mit dem verticalen unteren Theil bildet (Taf. V, Fig. 2). Der Cylinder steht auf einem Dreifuss und ist ganz mit einer doppelten Schicht eines wärme-isolirenden Stoffes bekleidet. Gerade an der Biegung ist ein Thermometer angebracht. Im oberen offenen Ende des Gefässes befindet sich ein doppelt durchbohrter Kautschukstopfen. In der einen Durchbohrung steckt ein Glasrohr *a*, das zum Rückflusskühler führt. Letzterer ist wiederum, ebenso wie bei dem früher beschriebenen Apparat, mit dem Manometer, dem Luftreservoir und der Wasserstrahlluftpumpe verbunden.

In die andere Durchbohrung passt ein 17^{mm} dicker kupferner Stab hinein, der eingefettet sehr bequem und luftdicht darin hin- und hergeschoben werden kann. In den Stab sind, wie die Zeichnung angiebt, sechs Löcher in solcher Entfernung von einander angebracht, dass, wenn eins derselben gerade vor den Stopfen geschoben ist, das nächst vorangehende im Innern desselben und ein drittes auf 3^{cm} Abstand hinter dem

Stopfen im Apparat sich befindet. Dadurch, dass der Stab jedes Mal ein Loch weiter hineingeschoben wurde, konnte man die in den Löchern enthaltenen Testobjecte während verschiedener Zeiträume dem Dampfe aussetzen.

Ebenso wie Rubner gebrauchte ich als Versuchsmaterial Milzbrandsporen. Von einer Suspension derselben in sterilem Wasser, worin pro Cubikmillimeter ungefähr 30 Keime enthalten waren, wurde mit einer Platinöse je ein Tröpfchen auf äusserst dünne kreisrunde Micascheibchen von 6^{mm} Durchmesser gebracht; jedes Scheibchen bekam, wie Controlversuche lehrten, etwa 100 Keime. Die Scheibchen wurden dann getrocknet und zwischen zwei Stückchen Filtrirpapier, deren Durchmesser ungefähr doppelt so gross war, eingeschlossen, indem die Ränder der letzteren mit Collodium auf einander geklebt wurden. Die betropfte Seite des Micascheibchens wurde mittels Anilinbleistift auf der Aussenseite des Papieres markirt. Hierdurch wusste ich nach Beenden des Versuches an welcher Seite die Sporen sich befanden. Die in solcher Weise angefertigten Papierkapseln passten genau in die Löcher des Stabes, ohne jedoch beim Schütteln herauszufallen.

Beim Anfang eines Versuches wurde der Stab also mit sechs dergleichen Probeobjecten versehen und so tief hineingeschoben, bis das zweite Loch gerade vor dem Stopfen sich befand; das erste befand sich dann in dem Stopfen. Es wurde darauf das Wasser, welches sich im verticalen Theile des Gefässes befand, zum Sieden erhitzt, und die Temperatur und der Druck in der früher beschriebenen Weise auf die gewünschte Höhe eingestellt und constant erhalten.

Wegen des Winkels, den die beiden Theile des Cylinders mit einander bilden, konnte das spritzende Wasser den Stab und die darin erhaltenen Objecte nicht benetzen, was störend gewirkt hätte. Denn nicht allein, dass man es alsdann nicht mit reiner Dampfwirkung zu thun gehabt hätte, sondern es könnten dabei auch die Sporen leicht von der glatten Oberfläche der Micaplättchen abgespült werden. Aus gleicher Ursache musste auch der Condensirung von Wasserdampf auf dem Stabe möglichst vorgebeugt werden. Es geschah dies mit Erfolg dadurch, dass der Stab vorgewärmt eingeführt und einer nachfolgenden Abkühlung entgegen gewirkt wurde durch Erhitzung des ausser dem Apparat hervor ragenden Theiles des Stabes mittels einer kleinen Flamme. — Durch Controlversuche überzeugten wir uns, dass die Sporen dadurch nicht geschädigt wurden.

Sobald als das Ticken eines auf dem Boden des Gefässes befindlichen Glasstückchens das Kochen des Wassers angab und Wasser aus dem Kühler zurückfloss, wurde der Stab ein Loch weiter hineingeschoben und so wurde mit bestimmten Zwischenzeiten fortgefahren, bis alle sechs Löcher sich in dem Apparat befanden. Am Ende des Versuches wurde

der Stab in einem Zuge ganz herausgenommen, die Micascheibchen waren sodann verschieden lange dem Dampfe ausgesetzt gewesen. Mit zwei sterilen Pincetten wurde nun die Kapsel herausgenommen und geöffnet, das Micaplättchen in geschmolzenen Agar-Agar übergebracht, mit einer Platinöse die Sporen abgerieben und ein Rollröhrchen davon angefertigt.

Auf diese Weise gelang es fast immer, die Scheibchen ganz von den Keimen zu befreien, es geschah nur selten, dass darauf noch eine Colonie zum Vorschein kam, ein grosser Vorthail also über die gewöhnlich für dergleichen Versuche benutzten Seidenfäden.

Resultate.

Von einigen Experimenten mit *Bac. pyocyaneus* abgesehen, beziehen sich meine Versuche über Sterilisirung durch Dampf bei niederem Druck ausschliesslich auf Sporen und zwar jene des Milzbrandbacillus.

Ich gebrauchte hierzu Sporen aus einer jungen und aus einer älteren Cultur, deren Unterschied in Resistenz schon aus den Kochversuchen hervorgegangen war. Vollständigkeitshalber gebe ich hier die Resultate in einer Tabelle wieder, wobei zu bemerken ist, dass es jetzt möglich war, auch kürzere Versuchszeiten als 1 Minute zu nehmen, was bei den Kochversuchen nicht gelang, weil die ganze Procedur der Probeentnahme dort zu viel Zeit beanspruchte.

Keine lebensfähigen Keime waren mehr anwesend bei:

Temperatur	Junge Cultur		Alte Cultur	
100° C.	—		nach	$\frac{1}{3}$ Minute
98° "	—		"	$\frac{1}{2}$ "
93° "	nach	$\frac{1}{4}$ Minute	"	$\frac{1}{2}$ "
94° "	"	$\frac{1}{4}$ "	"	$\frac{3}{4}$ "
92° "	"	$\frac{1}{4}$ "	"	$1\frac{1}{4}$ "
90° "	"	$\frac{1}{4}$ "	"	$1\frac{1}{4}$ "
88° "	"	1 "	"	$2\frac{1}{4}$ "
86° "	"	$1\frac{1}{4}$ "	"	3 "
85° "	"	$1\frac{3}{4}$ "	"	— "
83° "	"	$2\frac{1}{4}$ "	"	$4\frac{1}{2}$ "
81° "	"	4 "	"	8 "
80° "	"	— "	"	12 "
79° "	"	5 "	"	— "
78° "	"	6 "	"	25—30 "
76° "	"	10 "	"	— "
75° "	"	14 "	"	— "
73 $\frac{1}{2}$ ° "	"	20 "	"	> 1 Stunde
71° "	"	30—40 "	"	— "

Nachfolgend sind dieselben Ergebnisse graphisch dargestellt.

Fig. 7.

Wie bei den Curven angedeutet ist, gilt die eine für Material, das aus einer jungen Cultur entnommen war, das andere für Sporen derselben Cultur, welche inzwischen etwa 1 Monat älter geworden war.

Bei Temperaturen zwischen 90° und 100° macht ein Grad Differenz fast keinen Unterschied im Zeitpunkte des Absterbens.

Erst unter 90° werden bei der alten Cultur die Zeiten deutlich verlängert (1 bis 2 Min.), die Sporen jüngeren Datums sterben auch dann noch in sehr kurzer Zeit ($\frac{1}{4}$ bis 1 Min.).

Stellt man die von Rubner erhaltenen Resultate gleichfalls mittels einer Curve dar, so würde diese ungefähr dieselbe Form haben, aber im Ganzen höher liegen als die unserigen, sein Material muss resistenter gewesen sein, denn bei 90° waren zur völligen Vernichtung der Sporen schon 12 Minuten nöthig.

Gleich wie beim Kochen war auch bei unseren Versuchen mit Wasserdampf die Mehrheit der Keime schon nach kürzerer Zeit abgestorben; die überbleibenden (von den allerletzten abgesehen, vgl. S. 328) sind also ausschlaggebend für die Form der Curve.

Der Vergleich der mit Dampf erhaltenen Resultate mit dem der Kochversuche lehrte, dass die Sporen durch Dampf eher abstarben als durch Kochen bei derselben Temperatur, und obgleich es unwahrscheinlich

war, wollte ich doch erst noch untersuchen, ob vielleicht das Trocknen auf die Micascheibchen die Ursache davon sein könnte. Zu diesem Zwecke machte ich einen Kochversuch, wobei der Inhalt der Flasche mit einer Anzahl derselben Micascheibchen, wie die zu den Dampfversuchen benutzten, inficirt wurde. Das Resultat war, dass sie auch bei dieser Behandlung länger im kochenden Wasser als im Dampf am Leben blieben.

Nun blieb noch die Frage zu beantworten, ob der Dampf auch im Stande ist, vegetative Formen und zwar bei niederer Temperatur, gleich schnell oder schneller zu tödten als beim Kochen.

Der *Bac. pyocyaneus*, auf Micascheibchen eingetrocknet, war auch in diesem Falle sehr gut brauchbar. Das schnelle Austrocknen schadete ihm, wie zuvor festgestellt wurde, nicht, die Anzahl lebensfähiger Keime wurde hierdurch nicht merkbar vermindert. Ausserdem wurden die Versuche im Dampf und durch Kochen unmittelbar nach einander genommen und nach Beendigung der beiden Versuche machte ich noch ein Control-Rollröhrchen mit einem Scheibchen, das keiner der beiden Behandlungen ausgesetzt worden war. Es ergab sich nun, dass (bei 45° und 48°) der *Bac. pyocyaneus* schneller durch gesättigten Dampf als durch Kochen in einer physiologischen Kochsalzlösung getödtet wird. Darauf bin ich mit der Temperatur noch weiter hinunter gegangen und machte einen Versuch bei 34°. Auch jetzt war das Resultat ein ganz ähnliches.

Hier folgen zwei Tabellen, wo die Zeiten für Dampf und Kochen angegeben sind, erstens mit Bezug auf Milzbrandsporen dreierlei Resistenz und zweitens mit Bezug auf eine *Pyocyaneus*cultur.

Milzbrandsporen.

	Temperatur	Dampf	Kochen
I.	87° C.	< 3 Minuten	5—10 Minuten
II.	85° „	2 „	10—15 „
III.	80° „	5 „	> 1 Stunde

Bacillus pyocyaneus.

	Temperatur	Dampf	Kochen
	45° C.	< 10 Minuten	25—30 Minuten
	48° „	< 5 „	10—15 „
	34° „	45 „	7 Stunden

IV. Ueber die Erklärung der Koch- und der Dampfwirkung.

Zuerst erhebt sich die Frage: Warum sterben die Mikroben um so viel früher in einer kochenden Flüssigkeit, als wenn das Medium auf derselben Temperatur erhitzt wird ohne zu kochen?

Die verschiedenen hierbei in Betracht zu ziehenden Factoren sind: die Temperatur, der Mangel an Sauerstoff, die mechanische Wirkung der Flüssigkeitsströmungen und der Dampfblasen.

Erstens die Temperatur. Diese wurde in beiden Fällen, Kochen und Erwärmen, stets gleich genommen, so dass der Einfluss derselben ausgeschlossen war. Dass das Kochen auch unabhängig von der Temperatur schädigend auf die Keime einwirkt, geht schon daraus hervor, dass die Keime sogar vernichtet werden bei Temperaturgraden, die an und für sich unschädlich, ja sogar günstig sind.

Es wäre nun weiter möglich, dass die Keime aus Mangel an Sauerstoff starben, beim Kochen wird ja alle Luft aus dem Wasser vertrieben.

Um zu entscheiden, ob Mangel an Sauerstoff die Ursache des Absterbens war, wurde ein zur Hälfte mit einem Gemisch von 0·9 procentiger Kochsalzlösung und Bouilloncultur von *Bac. pyocyaneus* gefülltes Kölbchen mit der Saugpumpe verbunden, und die Flüssigkeit hierauf in einem Wasserbade, bei höchstens 30°, einige Minuten gekocht. Während des Kochens, als ich annehmen konnte, dass alle Luft ausgetrieben war, wurde der ausgezogene Hals mit der Stichflamme dichtgeschmolzen. Das also behandelte Kölbchen (Nr. 1) wurde dann während 7 Stunden in den Brütofen bei 37° gestellt; daneben zwei Controlkölbchen (Nr. 2 und 3), beide gleichfalls zur Hälfte mit der ursprünglichen Suspension gefüllt. Der Inhalt von Nr. 2 war einige Augenblicke bei 30° gekocht worden, doch darauf mit einem Wattepfropfen geschlossen, während Nr. 3 direct ohne irgend welche Vorbehandlung in den Ofen gestellt wurde.

Am Anfang und am Ende des Versuches wurden Rollröhrchen angefertigt. Das Resultat war eine, wenn auch geringe Abnahme der Keimezahl in allen drei Kölbchen.

Soviel geht aus diesem Versuch hervor, dass das Absterben des *Bac. pyocyaneus* nach einigen Stunden Kochens bei 37° nicht ohne Weiteres auf Mangel an Sauerstoff zurückzuführen ist. Die Verminderung der Keimezahl in allen Kölbchen glaube ich der kümmerlichen Nahrung, welche den Bacillen während ihres Aufenthaltes in der Kochsalzlösung geboten wurde, zuschreiben zu müssen, denn ich hatte die Salzlösung im Verhältniss von ungefähr 75:1 mit einer Bouilloncultur der Bacillen inficirt. In dieser Auffassung wurde ich verstärkt, als ich bei einem folgenden derartigen Versuch, anstatt eine Bouilloncultur zu gebrauchen,

einfach mit einer Platinöse ein wenig von einer Agar-Agarcultur abstrich, und dieses in die Kochsalzlösung vertheilte. Zwei gleich nach der Infection geimpfte Rollröhrchen zeigten nach 24 Stunden sozusagen eine einzige Colonie, während die am Ende des Experimentes aus den Kölbchen gemachten Rollröhrchen ganz steril blieben.

Nach diesen Vorversuchen habe ich mit den nöthigen Cautelen das Erstickungsexperiment mit *Bac. prodigiosus*, mit *Bac. pyocyaneus* und mit *Bac. coli* angestellt und zwar sowohl bei 43° als bei Zimmertemperatur. Das Resultat war, dass keine der Culturen getödtet wurde.

Dieses Resultat stimmt also vollständig mit Rubner's Meinung, dass der Sauerstoff der Luft keine oder höchstens eine sehr untergeordnete Rolle spielt. Uebrigens war schon a priori nicht wahrscheinlich, dass Sauerstoffmangel an und für sich die Keime zum Absterben bringe, wenigstens blieb dann unerklärt, warum *Bac. pyocyaneus*, bei 40° gekocht in 3 Stunden, bei 37° erst in 7 Stunden getödtet wurde, bei Temperaturgraden also, die als schädlich nicht zu betrachten sind. Auch ist zu bedenken, dass die Culturen im Laboratorium vielfach in luftdicht abgeschlossenen Reagirgläsern aufbewahrt werden, und darin oft Monate, ja Jahre lang am Leben bleiben. Es war jedoch denkbar, dass bei unseren Kochversuchen die Combination von Sauerstoffmangel und Wärme den Tod der Mikroorganismen herbeiführte; dies ist nun wenigstens durch unsere soeben mitgetheilten Experimente ausgeschlossen.

Eine dritte Erklärung für das Absterben der Mikroben in einer kochenden Flüssigkeit, selbst bei einer Temperatur, wobei sie gewöhnlich nicht nur am Leben bleiben, sondern sogar sich noch vermehren können, bleibt noch zu besprechen übrig. Die mechanische Wirkung der Flüssigkeitsströmungen sowie der Dampfblasen dürfte vielleicht schon genügen, die Keime zu tödten.

Horvath¹ war der erste, der durch mechanische Bewegung, durch Schütteln in einem Schüttelapparat, Bakterien getödtet hat; nach ihm haben eine Anzahl von Forschern mit verschiedenen Modificationen und mit ebenso wechselnden Resultaten diese Experimente wiederholt.

Meltzer² versucht diese Widersprüche zu lösen. Sie sind nach ihm nur scheinbar und vielleicht oft genug gegenseitige Ergänzungen. In vielen Fällen kann nur langdauernde starke Bewegung die Entwicklung von Mikroorganismen hemmen oder ganz aufheben. Dass dem gegenüber schwache Bewegungen der Entwicklung förderlich sein können, steht damit gar nicht in Widerspruch. Zwar fanden einige Autoren auch nach

¹ Pflüger's *Archiv*. 1878.

² *Archiv für Biologie*. 1894.

kräftigerem Schütteln keine Verminderung, doch dann rührten die Misserfolge wahrscheinlich von der Methode des Schüttelns her, indem die Flüssigkeitsmasse dabei nur erschüttert und nicht mit grosser Heftigkeit gegen die Wand des Gefässes geschleudert wurde. Dies geschieht aber nur dann, wenn eine nur theilweise gefüllte Flasche mit Heftigkeit und Geschwindigkeit in der Längsrichtung hin und her bewegt wird.

Bei seinen eigenen Versuchen bediente auch Meltzer sich einer Schüttelmaschine. Die Bewegung war eine horizontale, die Schwingungsweite ungefähr 40 cm, die Zahl der Stösse betrug etwa 180 in der Minute. Die nur zu einem Drittel gefüllten Flaschen lagen horizontal und zwar in der Richtung der Bewegung. Die Maschine war nur 9 Stunden täglich im Gange, von 8 bis 12 Vormittags und 1 bis 6 Nachmittags. Die Temperatur des Versuchsraumes bewegte sich ungefähr zwischen 16 und 22° C.

Aus seinen Versuchen geht hervor, dass der *Bac. megaterium* durch heftiges Schütteln nicht nur in der Entwicklung aufgehalten wird, sondern völlig vernichtet werden kann. Beim Schütteln mit Glasperlen blieb die Cultur fast immer keimfrei, aber auch beim einfachen Schütteln, ohne Beimengung von Glasperlen, wurde bei längerer Dauer des Versuches in den meisten Fällen das gleiche Resultat erzielt.

Die kürzeste Schüttelzeit, während welcher bereits eine völlige Vernichtung der Keime sich vollzog, war 10 Stunden. Auch mit anderen Mikroorganismen wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, wobei sich aber je nach der Species grosse graduelle Unterschiede herausstellten.

Was die mikroskopisch zu constatirenden Aenderungen anbetrifft, welche die Bakterien in Folge des Schüttelns erfahren, so findet sich bei Meltzer die Angabe, dass sie nicht in sichtbare Trümmer, sondern zu nicht unterscheidbarem feinen Staub verwandelt werden. Indem wir nach Obigem annehmen, dass die Mikroben durch Schütteln vernichtet werden können, so wollen wir doch darauf aufmerksam machen, dass dies erst nach sehr langer Zeit der Fall war (die kürzeste Zeit betrug bei Meltzer 10 Stunden), während bei unseren Kochversuchen, auch innerhalb physiologischer Temperaturgrenzen, der Tod in viel kürzerer Zeit eintrat. Lediglich aus der Bewegung der Flüssigkeit und der Dampfblasen beim Kochen ist dies also nicht wohl erklärbar.

Nichtsdestoweniger habe ich, um diese Möglichkeit genauer zu controliren, selber noch mehrere Experimente gemacht und Luft- oder Gasblasen durch mikrobenhaltige Flüssigkeiten hindurchstreichen lassen, dabei so viel wie möglich die Wirkung des Kochens nachahmend.

Bei meinem ersten Experimente verband ich die kurze Röhre einer Spritzflasche mit der Wasserstrahlluftpumpe, die lange, welche in die

bakterienhaltige Flüssigkeit hineintauchte, war an deren freien Ende mit einem Wattepfropfen verschlossen. Durch die Saugwirkung trat die Luft durch den Wattepfropfen hindurch, sprudelte in der Flüssigkeit auf und wurde dann wieder durch die kurze Röhre fortgesaugt.

Das Durchstreichen der Luft auf diese Weise, sogar während einiger Stunden, war nicht im Stande, die Anzahl lebensfähiger Keime zu vermindern. Die auf diese Weise entstehenden grossen und nicht sehr zahlreichen Blasen sind aber streng genommen nicht mit denjenigen, welche durch das Kochen entstehen, zu vergleichen und darum wurde versucht, die Luftblasen kleiner und zahlreicher zu machen. Dies ist jedoch äusserst schwierig; führt man die Luft durch Glaspulver, durch Glasperlen, durch die Sprühöffnungen eines Giessers, immer giebt es einzelne Stellen, wo der Widerstand geringer ist; dort passiert stets die grösste Luftmenge und die Folge ist, dass man doch wieder weniger zahlreiche und grössere Blasen bekommt. Es wurde darum die Flüssigkeitssäule dünner genommen und kleine Gasblasen in ununterbrochener Reihe von unten nach oben hindurchgeführt; die dadurch bedingte Bewegung war zum Mindesten ebenso stark wie beim Kochen.

Um unseren Kochversuchen möglichst nahe zu kommen, erwärmte ich ausserdem die Flüssigkeit und beraubte die hindurchzuführende Luft zuvor ihres Sauerstoffes.

Das Experiment wurde in folgender Weise eingerichtet.

Die Bakteriensuspension (*Bac. pyocyaneus*) wurde in den unteren bis zu 6^{mm} Durchmesser verengten Theil eines Röhrchens von Liborius¹ gefüllt, dessen oberer Theil kugelförmig erweitert war, um zu verhindern, dass die Flüssigkeit durch den Luftstrom herausgejagt wurde.

Das Röhrchen war derartig mit der Saug- und Blaseöffnung der Wasserstrahlpumpen verbunden, dass immer dieselbe Luft hindurchging. Diese Luft passierte, ehe sie in das Röhrchen von Liborius kam, durch drei Waschflaschen mit Pyrogallol und Kalilauge und durch eine vierte Waschflasche mit Wasser. Letztere war ebenso wie die Bakteriensuspension in ein Wasserbad bei 43° gestellt.

Es stellte sich heraus, dass Bouillonculturen auch bei starker Verdünnung mit Kochsalzlösung wegen des Schäumens nicht zu gebrauchen war; sie wurde darum durch eine Culturen in 1 pro mille Asparagin und 1 pro mille Glucose, ein Nährsubstrat, womit der *Bac. pyocyaneus* ganz zufrieden ist, ersetzt. Zur Ausführung des Experimentes war die Culturen noch mit derselben Flüssigkeit verdünnt worden.

¹ Diese Zeitschrift. Bd. I.

Gleichzeitig wurde ein Theil derselben Suspension gekocht und zwar ebenso bei 43° und zur Controle eine dritte Portion ohne Weiteres daneben in das Wasserbad gestellt. Es ergab sich jetzt, dass nach gut einer Stunde der *Bac. pyocyaneus* durch das Kochen schon abgestorben war, während sogar nach 2 Stunden im Röhrchen von Liborius (ebenso wie in dem Controlröhrchen) noch zahlreiche Keime am Leben waren, und doch war die Bewegung der Flüssigkeit durch die Luftblasen hier viel stärker als beim Kochen.

Dass die Bacillen nicht allein durch die aufsteigenden Luftblasen und die dadurch verursachte kräftige Bewegung der Flüssigkeit getödtet wurden, ist ein schlagender Beleg dafür, dass man die Ursache des Todes der Bakterien beim Kochen nicht im Bombardiren der Zellen durch die Dampfblasen suchen soll.

Man könnte sich aber eine schädliche Wirkung der Dampfblasen noch auf andere Weise denken. Es könnte sein, dass während des Kochens sich im Bakterienkörper mikroskopische Dampfbläschen bildeten, die den Bakterienkörper vernichteten.

Für die experimentelle Inangriffnahme dieser Frage erschienen Mikroorganismen mit relativ grossen Dimensionen am geeignetsten.

Es wurde zunächst käufliche Hefe gewählt und zwar in Form einer Suspension von 18 Volumeinheiten auf 100 Volumeinheiten 0.5procentiger Kochsalzlösung.

Vor dem Anfang des Experimentes wurde eine Probe der Suspension unter dem Mikroskop betrachtet nach Vermischung mit stark verdünnter Methylenblaulösung. Hierbei sieht man, dass die etwa vorhandenen todtten Zellen sich färben, indem die lebendigen ungefärbt bleiben. Dann wurde die Hefe in der Flasche *B* (Taf. V, Fig. 1) bei ca. 35° gekocht.

Von einem Zerrissen- oder Zersprengtwerden der Hefezellen war auch nach 3 Stunden Kochens nichts zu verspüren. Die Zellen scheinen ganz unverletzt zu bleiben. Selbst wurden die jungen Hefezellen nicht von den alten abgerissen.

Bei Färbung mit verdünntem Methylenblau sah ich jedoch die Zahl der gefärbten Zellen im Verhältniss zu den ungefärbten in der gekochten schneller als in der im Reagensglas einfach erhitzten Suspension zunehmen.

Ebensowenig konnte ich in mehreren Versuchen irgend eine mechanische Läsion bei *Sarcina ventriculi* beobachten, als ich diese eine Zeit lang bei niederem Druck kochte; nach 2 Stunden energischen Kochens z. B. bei 44° C. waren die Packetchen noch ganz intact!

Wo aber keine gröberen Aenderungen an den gekochten Zellen zu beobachten waren, da könnte doch sehr wohl die feinere Structur verändert sein; hierin wäre alsdann die Ursache des Todes zu suchen.

Dass das Protoplasma permeabler geworden war, konnte ich auf mancherlei Weise darthun. Wir sahen schon, wie die Zellen sich zu wässerigem Methylenblau verhalten; sogleich werden wir sehen, dass durch Kochen das Eiweiss des Protoplasma in die umgebende Flüssigkeit übergeht, später kommen noch mehrere Beweise für das Permeabelwerden der Zellen hinzu.

Wenn ich die Hefesuspension vor dem Kochen oder Erhitzen filtrirte, gab das klare Filtrat nur sehr schwach die Biuretreaction. Stärker jedoch war die Lilafarbe, welche man bei Ausführung der Reaction mit dem Filtrat der erhitzten Hefe bekam, und am stärksten mit dem der gekochten Hefe.

Es ist also sehr wahrscheinlich, dass durch Kochen die Zellen geschädigt, permeabel werden und stickstoffhaltige Stoffe hinaustreten.

Ein anderes Mittel, um festzustellen, ob die Permeabilität des Protoplasma verändert sei, wurde mir von Prof. Eijkman an die Hand gegeben. Er hatte nämlich gefunden, dass das Leitungsvermögen für Elektrizität einer Hefesuspension bedeutend zunimmt, wenn man die Hefezellen, sei es durch Erhitzung bei 60 bis 70° oder mittels Formalin oder Carbolsäure tötet, und glaubt dies dem Zunehmen der Permeabilität zuschreiben zu müssen. Gleich wie in dem vorigen Versuche nahm ich eine Hefesuspension in 0.5 Procent NaCl und zwar 100 Volumen Kochsalzlösung und 10 Volumen Hefe. Die Suspension wurde in drei Theile getheilt. Der erste wurde bei Zimmertemperatur aufbewahrt, der zweite in einem Wasserbade auf ungefähr 45° erhitzt, der dritte bei derselben Temperatur gekocht; beides während 2½ Stunden.

Ganz in Uebereinstimmung mit dem durch die Biuretreaction erhaltenen Resultat wurde hier der grösste Widerstand in der bei Zimmertemperatur aufbewahrten Suspension gefunden, weniger gross, obgleich nur wenig abgenommen, war der Widerstand der auf 45° erwärmten Suspension; viel besser leitfähig dagegen war die gekochte Suspension geworden. Wenn man dieselbe in Zahlen ausdrückt und den Widerstand des bei Zimmertemperatur Aufbewahrten gleich 100 setzt, findet man:

A	Widerstand der Suspension während 2½ St. bei Zimmertemp.	100
B	„ „ „ nach 2½ „ Erhitzung bei 45°	91
C	„ „ „ „ 2½ „ Kochens „ 45°	76.9
D	„ „ 0.5 procentigen Kochsalzlösung	80.6

Hiernach wurde die Suspension C noch ein Mal bis zu ungefähr 90° erhitzt, damit man gewiss sei, dass alle Zellen getödtet waren; der Widerstand war nicht nennenswerth vermindert: 76.4.

Waren die Zellen permeabel geworden, so musste es sich auch als unmöglich herausstellen, Plasmolyse zu Wege zu bringen, denn diese beruht gerade darauf, dass das Protoplasma bloss für Wasser und nicht für gelöste Stoffe durchgängig ist. In der That zeigten die gekochten Zellen, in concentrirte Salzlösung versetzt kein Plasmolyse mehr.

Da die bloss erhitzte Hefe bei diesem ersten Experimente auch schon gelitten hatte, wie die gesteigerte Biuretreaction, die Abnahme des elektrischen Widerstandes und die Färbung mit wässrigem Methylenblau anzeigten, versuchte ich den Unterschied zwischen Kochen und Erhitzen dadurch deutlicher zu machen, dass ich bei noch niedriger Temperatur operirte.

Während 3 Stunden wurde eine Hefesuspension bei 27° gekocht. Das Resultat war viel geringer als nach dem Kochen bei 45°. Biuretreaction und Methylenblaufärbung zeigten keinen deutlichen Unterschied zwischen gekochter und erhitzter Hefe.

Die Widerstandsbestimmung gab jedoch noch einen Unterschied, wie die folgenden Ziffern zeigen:

I. Ursprüngliche Suspension	100
II. Filtrat dieser Suspension	91.1
III. Suspension gekocht bei 27°.	96.4
IV. Filtrat von III	88.4
V. Nr. III darnach auf 90° erhitzt	92.1
VI. Suspension bloss erhitzt auf 27° . . .	98
VII. Filtrat von VI	90.1
VIII. Nr. VI auf 90° erhitzt	93.3

Diese Experimente zeigen also, dass das Kochen die Hefezellen permeabler machen kann, dass diese Wirkung jedoch durch Temperaturerhöhung sehr gefördert wird.

Ich versuchte nun den Einfluss des Kochens zu erhöhen und zwar auf dieselbe Weise, wie bei den Versuchen mit *Bac. pyocyaneus* (S. 339) beschrieben worden ist. Die Temperatur wechselte hier gleichfalls von 40° bis 37°. Nach ungefähr einer Stunde stellte ich das Experiment ein, aber sogar dieses ungestüme Kochen war nicht im Stande, die Hefezellen zu zersprengen; Biuretreaction zeigte wohl einen Unterschied mit der bloss erhitzten Hefe, aber doch sehr wenig, ebenso wie die Färbung mit Methylenblau. Nur die Widerstandsbestimmung liess wieder erkennen, dass eine Schädigung der Zelle stattgefunden hatte.

I. Widerstand der ursprünglichen Suspension	100
II. Filtrat von I	92.4
III. Suspension etwa 1 Stunde bei 36 bis 40° gekocht . . .	97
IV. „ „ 1 „ auf 36 bis 40° erhitzt . . .	98.5

Obgleich ich noch mehrmals Experimente mit Hefe machte, kam nie wieder so deutlich der Unterschied zwischen Kochen und Erhitzen an's Licht als das erste Mal, als die Temperatur höher war als bei allen nachfolgenden Versuchen.

Wir finden also, dass die Wirkung des Kochens auf die Hefezellen durch eine bestimmte Temperatur unterstützt werden muss; wählt man diese zu niedrig, dann tritt der Unterschied nicht deutlich auf, es sei denn nach längerer Zeit: ein Resultat, das vollständig mit dem für Bakterien von uns gefundenen Resultat übereinstimmt.

Weiter verglich ich die Wirkung des Kochens und Erhitzens auf rothe Blutkörperchen. Zu diesem Zweck diente mit Pferdeserum verdünntes defibrinirtes Pferdeblut. Durch blosse Erhitzung bei Temperaturen zwischen 35 und 50° trat bei keinem dieser Versuche irgend eine Veränderung auf; durch Kochen jedoch wird das Blut schwarzbraun. Auf dem Boden des Gefässes befinden sich zahlreiche braune Klümpehen, die unter dem Druck des Deckglases aus einander gehen und aus zusammengeklebten Blutkörperchenschatten bestehen. Nach Centrifugiren findet man das Serum durch Hämoglobin intensiv roth gefärbt. Es ist eigenthümlich, dass alle diese durch Kochen unter erniedrigtem Druck bedingten Aenderungen im Blute schon sehr bald auftreten und wenig von der Temperatur abhängig sich zeigen. Sie gingen bei 35° kaum langsamer von statten als bei 50°. Bei 35° ist das Serum nach 10 Minuten Kochens schon stark lackfarbig geworden, sogar nach einer Minute ist bereits Hämoglobin ausgetreten.

Es war immer noch möglich, dass durch Schütteln allein das Blut schon lackfarben würde. Bei, während einer Stunde in einem Reagirglase mit der Hand geschütteltem Blute, konnte ich in der That, im Gegensatz zu Meltzer und Welch (vgl. S. 347, Fussnote), Austreten von Hämoglobin feststellen, wenn auch in viel geringerem Grade als im gekochten Blute.

Mir schien es nach alledem, als müsse die Kochwirkung einen mehr chemischen als mechanischen Charakter haben, und es versteht sich, dass ich dabei in erster Linie an das Eiweiss der Zellen dachte.

Ich nahm darum Hühnereiweiss, das 10 Mal mit Wasser verdünnt war und brachte dasselbe in die Flasche B (Taf. V, Fig. 1), zugleich zur Controle einige Cubikcentimeter in das Reagirglas r. Nach ungefähr einer Viertelstunde Kochens bei 49° bildete sich ein Coagulum, das in Form von Fäden in die Flasche ausgespannt war, die Flüssigkeit blieb jedoch klar, ebenso wie die im Reagirglase r; das Filtrat aus der Lösung in der Flasche zeigte keine Biuretreaction mehr. Erhöhte sich dann die Temperatur bis zu ca. 60°, so trat in dem Inhalt der Flasche keine

Coagulation mehr auf, während der des Reagirglases milchweiss wurde. Durch Kochen bei 49° also verwandelt sich das Eiweiss, es coagulirt; durch blosses Erhitzen bei 49° nicht. Nachdem ich diese Experimente gemacht hatte, bekam ich eine Abhandlung von Ramsden¹ „Ueber das Coaguliren von Eiweissstoffen durch Schütteln“ zu Gesicht.

Er fand zunächst, dass durch Schütteln in Eiereiweiss ein faseriges oder häutiges Gerinnsel entsteht, das unter dem Mikroskop Fibrin sehr ähnlich sieht. Diese Coagula geben Eiweissreaction, weichen aber in mancher Beziehung von den durch Hitze entstehenden Coagula ab. Auch mit einer Lösung von Hofmeister's krystallinischem Eialbumin in reinem Wasser konnte er durch Schütteln diese Gerinnsel bekommen, ein Beweis also, dass diese aus Eiweiss und nichts als Eiweiss bestehen, und dass zum Coaguliren die mechanische Bewegung sich als hinreichend erweist.

Smee² bekam in einer filtrirten Eiweisslösung dadurch, dass er 4 Stunden lang Sauerstoff hindurchführte, ein Coagulum, dass er für Fibrin hielt; Durchführen von Kohlensäure und Wasserstoff gab kein Gerinnsel.

Ramsden³ glaubt hier nicht an die Wirkung des Sauerstoffes, aber er glaubt, die Gerinnung auf die mechanische Wirkung der aufsteigenden Gasblasen zurückführen zu müssen.

Aus dem Vorhergehenden ergibt sich die Möglichkeit, dass bei unseren Kochversuchen die aufsteigenden Dampfblasen das Coaguliren verursacht haben, nur sei darauf hingewiesen, dass beim Kochen der Eiweisslösung unter niederem Druck das Gerinnen um so viel eher auftritt als auf rein mechanischem Wege, und dass die Temperatur einen überwiegenden Einfluss hat.

Es erscheint mir angebracht, hier auf die Kochversuche mit Milch zurückzukommen. Eine Eiweissgerinnung fand dabei, wie gesagt, nicht statt, wohl aber eine andere Umsetzung, welche auch als eine chemische zu betrachten ist. Wie bekannt, kommt frischer Milch die Eigenschaft zu, H_2O_2 zu spalten, was sich durch eine Blaufärbung verräth bei nachträglichem Zusatze von Jodkalikleister. Anstatt Jodkalikleister kann auch Paraphenylendiamin oder Guajäctinctur Verwendung finden. Es tritt dann ebenso eine blaue Verfärbung auf. Auf 80° erhitzte Milch zeigt die Reaction nicht mehr.

Wie bei der Besprechung der Sterilisation von Milch schon mit einigen Worten angedeutet wurde, verschwindet diese Enzymreaction eher,

¹ *Archiv für Physiologie*. 1894.

² *Proc. Royal Society*. XII.

³ A. a. O.

wenn man die Milch kocht, als wenn man sie auf dieselbe Temperatur bloss erhitzt.

Meine Versuche lehrten, dass diese Reaction durch Erhitzung der Milch mit oder ohne Kochen auf ungefähr 76° innerhalb 5 Minuten verschwindet. Operirte ich bei niederer Temperatur, so verschwand die Reaction durch Kochen eher als durch Erhitzen; je niedriger die Temperatur genommen wurde, um so grösser der Zeitunterschied. Bei 70° ist die Zeit für das Kochen ungefähr 15 Minuten, für blosses Erhitzung ungefähr 40 Minuten, während bei 67° einstündiges Kochen die Reaction zum Verschwinden bringt, blosses Erwärmen dagegen nicht mehr.

Zu meiner grossen Ueberraschung stellte sich heraus, dass Durchblasen von Luft gleichfalls die Reaction zum Verschwinden bringt, sogar schon bei Zimmertemperatur. Meine erste Vermuthung war, dass das sogenannte Enzym der Milch gar kein Enzym sei, sondern ein flüchtiger Stoff, ein Gas vielleicht. In dieser Richtung angestellte Versuche, wobei Milch in vacuo destillirt wurde, ergaben jedoch durch den negativen Ausfall der Reaction im Destillat, dass der gesuchte Stoff nicht flüchtig war, es wäre denn, dass er nicht in Wasser, wohl aber in Milch löslich sei. Ich wiederholte darum das erste Experiment und brachte dabei in den Empfänger Milch, die durch momentanes Aufkochen der Reaction beraubt war. Das Resultat war gleichfalls ein negatives.

Schliesslich fand ich, dass schon durch blosses Schütteln der Milch mit der Hand in einem geschlossenen Reagirglase die Reaction bedeutend geschwächt wird.

Ich glaube also auf Grund dieser und vorhergehender Experimente annehmen zu dürfen, dass die Wirkung des Kochens in diesen Fällen eine mechanische sei, die chemische Umsetzungen veranlasst.

Nach dieser Abschweifung will ich auf die ursprüngliche Frage zurückkommen: Warum tödtet Kochen bei niederem Druck die Mikroben schneller als Erhitzen zu derselben Temperatur bei gewöhnlichem Druck?

Ich glaube wahrscheinlich gemacht zu haben, dass die Zellen in Folge von Aenderungen des Protoplasma sterben; im Anschluss daran werden sie permeabel. Ausgeschlossen ist grobmechanische Läsion, nie sah ich etwas, was darauf hindeutete.

Es scheint mir also nicht allzu gewagt, die folgende Hypothese aufzustellen:

Beim Kochen einer Suspension lebendiger Zellen entstehen intracelluläre Dampfblasen, diese vernichten die feinere Structur des Protoplasma und im Anschluss hieran wird die Zelle permeabel. Wir werden sehen, was zu Gunsten dessen zu sagen sei.

Das schnellere Absterben der Bakterien durch Kochen wird unmittelbar dadurch erklärt.

Zu Gunsten der Hypothese sprechen weiter:

1. Die Kochversuche mit Hefe: Färbung mit Methylenblau, Biuret-reaction, Plasmolyse, Widerstandsbestimmung, alles deutet in diesem Sinne.

2. Die Kochversuche mit Pferdeblut, das Lackfarbigwerden des Serums, die grosse Anzahl Schatten.

3. Die Experimente mit *Bac. pyocyaneus* und Hefe, wobei das Kochen intermittierend aber sehr energisch stattfand. Die Bakterien waren in ein Viertel der Zeit, die für fortgesetztes Kochen bei 40° erfordert wird, abgestorben. Vollkommen zu erklären ist dies, wenn man bedenkt, dass durch die plötzliche Druckerniedrigung die Entwicklung der hypothetischen intracellulären Dampfblasen sehr gefördert werden muss.

Dass *Bac. pyocyaneus* bei 40° C. viel schneller getötet wird als bei 37°, wird durch die Annahme erklärlich, dass im letzten Falle die Mikroben lebensfrischer sind.

Es bleibt also noch die Frage zu beantworten: Warum steht Kochen in tödtender Wirkung hinter gesättigtem Dampf derselben Temperatur zurück?

Wenn man in Betracht zieht, dass bei den Experimenten mit Dampf die Keime getrocknet waren, so könnte man sich vorstellen, dass durch Aufnahme hygroskopischen Wassers bei dem Aufenthalte im Dampf inner- und ausserhalb der Zellen eine concentrirte Salzlösung entsteht, die schädlich auf die Keime einwirkt.

Auf vegetative Formen wirkt, wie bekannt, eine concentrirte Salzlösung sehr nachtheilig ein. Zum Ueberflusse machte ich ein Experiment mit *Bac. pyocyaneus*: in einer gesättigten Kochsalzlösung stirbt er bei 37° in einer halben Stunde.

In Uebereinstimmung mit dieser Hypothese sind einige schon bekannte Thatsachen.

Mit Luft gemischter Dampf, ebenso wie überhitzter Dampf wirken weniger schnell als gesättigter Dampf: die erforderliche Quantität Wasser wird weniger schnell angeboten und aufgenommen.

Ist aber die Hypothese richtig, beruht also der schnellere Tod der Bakterien und Sporen bei Einwirkung gesättigten Dampfes auf der Entstehung gleichsam eines starken Pökels, so müssten auch die in einer physiologischen Salzlösung erhitzten Sporen länger am Leben bleiben als in einer concentrirten Lösung. Ein Controlversuch ergab aber, dass die Sporen in der gesättigten und in der physiologischen Salzlösung in der gleichen Zeit abgestorben waren.

Unsere Hypothese, dass bei der Einwirkung des Dampfes auf getrocknetes Bakterienmaterial die dabei entstehende concentrirte Salzlösung mit eine Rolle spielt, wird also, was die vegetativen Formen betrifft, bestätigt. Mit Rücksicht auf Sporen dagegen trifft, wie wir ja schon erwarteten, diese Erklärung nicht zu und musste man sie also in anderer Richtung suchen.

Wir glauben, dieselbe im Folgenden gefunden zu haben: Bekanntlich erhöhen in Wasser gelöste Stoffe den Kochpunkt desselben, ohne dass die Temperatur des Dampfes gleichzeitig erhöht wird. Eine unter atmosphärischem Drucke z. B. bei 110° kochende Salzlösung entwickelt ja Wasserdampf von nur 100°. Umgekehrt kann man, indem man Wasserdampf durch eine Salzlösung leitet, die letztere über die Temperatur des Dampfes, bis in die Nähe ihres Kochpunktes, erhitzen. Die dazu erforderliche Calorienmenge wird von der bei der Condensation des Dampfes frei werdenden Wärme geliefert.

Dass die Kochtemperatur nicht ganz erreicht wird, liegt daran, dass die Lösung an die niedriger temperirte Umgebung Wärme abgibt. Die Salzlösung hat mithin das Bestreben, sich mittels der von dem Dampf zugeführten Wärme bis zum Kochpunkt zu erhitzen, wird aber caeteris paribus um so mehr davon entfernt bleiben, je niedriger die Temperatur des Dampfes ist.

Es ist einleuchtend, dass diese Betrachtung auf den vorliegenden Fall, wo wir es mit eingetrocknetem, bakterienhaltigem Material zu thun haben, Anwendung finden kann, wenn man bedenkt, dass durch Wasseraufnahme eine concentrirte Salzlösung gebildet wird. Die in dieser Lösung eingebetteten Keime werden mit derselben eine höhere Temperatur annehmen, und so erklärt sich ungezwungen, warum sie schneller absterben als in kochendem Wasser von demselben Wärmegrad als der des Dampfes.

Schliesslich braucht kaum hervorgehoben zu werden, dass die oben gegebene Erklärung nicht nur für Sporen, sondern auch für vegetative Formen Geltung hat, so dass das raschere Absterben letzterer im Dampf als im Wasser gleicher Temperatur nicht nur auf reine Salzwirkung zurückzuführen ist.

Schlussfolgerungen.

1. Durch blosse Erhitzung sterben in einer Flüssigkeit suspendirte Bakterien und Sporen weniger schnell ab als durch Kochen bei derselben Temperatur.

2. Innerhalb gewisser Grenzen nimmt bei Erhitzung die Dauer des Absterbens der vegetativen Formen ziemlich gleichmässig mit steigender Temperatur ab.

3. Durch Kochen bei erniedrigtem Druck sterben die Bakterien sogar innerhalb der physiologischen Temperaturgrenzen ab. Die Dauer des Absterbens nimmt mit steigender Temperatur erst schnell, danach langsamer ab.

4. Die letzterwähnte Form der Curve resultirt für Sporen sowohl bei blosser Erhitzung als beim Kochen.

5. Gesättigter Dampf übertrifft bei jeder Temperatur das Kochen in tödtender Wirkung; von der höchsten Temperatur an gerechnet fällt die Curve erst steil herab, ein Grad Unterschied hat da wenig Einfluss auf die Dauer des Absterbens, bei niedriger Temperatur nimmt dieser Einfluss stark zu.

6. Grossen Einfluss auf die Resistenz haben: die Temperatur, wobei die Mikroben gezüchtet wurden, das Medium, in welchem sie suspendirt sind; für Sporen nimmt bis zu einem gewissen Maasse die Resistenz mit dem Alter der Cultur zu.

7. Zur Vernichtung der vegetativen Formen, speciell der pathogenen Keime, ist eine Erhitzung während einer halben Stunde bis zu 60° sicherlich genügend, bei Milch unter der Bedingung, dass das Gefäss geschlossen sei.

8. Gesättigter Dampf von 90° steht in Wirkung praktisch nicht hinter gesättigtem Dampf von 100° zurück.

9. Die Erklärung des nachtheiligen Einflusses, den das Kochen auf die Keime ausübt, beruht vielleicht auf dem Entstehen von Dampfblasen innerhalb des Bakterienkörpers. Jedenfalls hat die mechanische Wirkung des Kochens chemische Umsetzungen zur Folge.

10. Es ist wahrscheinlich, dass Wasserdampf dadurch ungleich viel schneller abtödtend wirkt als kochendes Wasser von gleich hoher Temperatur, dass die getrockneten Sporen bzw. Bakterien im Dampf einen höheren Wärmegrad erreichen, als der Dampf selber besitzt.

Ich fühle hier die Pflicht, Hrn. Prof. Dr. C. Eijkman meinen lebhaften Dank dafür abzustatten, dass er mich diese Untersuchungen in seinem Laboratorium anstellen liess, und für seine Hülfe und mehrfach ertheilten Rath.