[Aus dem patholog.-bakteriologischen Institute der K. K. Kranken-Anstalt
„Rudolfstiftung“ in Wien.]
(Prof. R. Paltauf.)

Zur Methodik der Bakterienzählung.

Von

Dr. Heinrich Winterberg.

Eines der theoretisch und praktisch wichtigsten Probleme der Hygiene und Bakteriologie ist die Methodik der Bakterienzählung.

Die Beurtheilung der Vermehrungsgeschwindigkeit der Bakterien unter normalen Verhältnissen sowie unter dem Einflusse ihr Wachsthum hemmender oder befördernder Agentien chemischer oder physikalischer Natur, die exacte Prüfung des Keimgehaltes von Wasser, Luft u. s. w. ist nur auf diesem Wege möglich.

Seitdem R. Koch¹ die Methode der Plattenzählung in die Wissenschaft und Praxis einführte, hat dieselbe immer mehr an Terrain gewonnen und wird heute als mikroskopische Plattenzählung nach M. Neisser² ganz allgemein und fast ausschliesslich geübt.

Drei wesentliche Voraussetzungen liegen derselben zu Grunde:

1. Aus jedem Keime entsteht eine Colonie.
2. Alle lebensfähigen Keime wachsen unter den gewählten Culturbedingungen zu Colonieen aus.
3. Die gewachsenen Colonieen sind für uns erkennbar und zählbar.

Die letztere Bedingung ist durch die Verwendung des Mikroskopes bei der Plattenzählung, wenigstens insoweit es sich um isolirt stehende

¹ R. Koch, *Mittheilung a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte*. 1881. Bd. I. S. 27, 36.

² M. Neisser, Die mikroskopische Plattenzählung und ihre specielle Anwendung auf die Zählung von Wasserplatten. *Diese Zeitschrift*. 1895. Bd. XX. S. 119.

Ansiedelungen handelt, so ziemlich erfüllt, wie dies M. Neisser in einer ausführlichen Untersuchungsreihe dargethan hat.

Dagegen fehlt uns jede genaue Vorstellung darüber, inwieweit die beiden ersten Bedingungen zutreffend sind.

Schränkt schon die zweite Voraussetzung die erste ganz wesentlich ein, so entzieht sich die Annahme, dass jeder lebensfähige Keim unter den gewählten Culturbedingungen eine Colonie bildet — sie mag noch so wahrscheinlich sein — dennoch einer einwandfreien Kritik. Denn um die Lebensfähigkeit einzelner Keime zu erweisen, steht uns kaum ein anderes Mittel zu Gebote, als gerade ihr Vermögen, sich zu vermehren und so Colonieen zu bilden.

Die gewählten Culturbedingungen müssen ferner dem jeweiligen Optimum für jede Bakterienart genau angepasst sein. Für Keimgemische bedeutet diese Forderung eine directe *Contradictio in adjecto*. Für Reinculturen ist sie wohl kaum allgemein erfüllbar. Von allen anderen Umständen abgesehen, bietet schon die Aufgabe, die Zusammensetzung des Nährbodens auf das Optimum einzustellen, die grössten Schwierigkeiten.

So hat A. Reimsch¹ gefunden, dass Trinkwasser bei Vermehrung des Alkaligehaltes der Gelatine durch Zusatz von 0.005 Soda bicarbonica das 2¹/₂ fache, von 0.01 desselben Salzes mehr als das 6 fache der Keime aufweist.

Aber auch unter der Voraussetzung, dass jeder fortpflanzungsfähige Mikroorganismus eine Colonie bildet, ist es noch mehr als fraglich, ob eine jede der so entstandenen Ansiedelungen auch für sich allein als solche erkennbar sei.

Schon eine oberflächliche Durchmusterung von Zählungsplatten zeigt, dass die Verhältnisse durchaus nicht einfach liegen. Die einzelnen Colonieen sind von der verschiedensten Grösse. Bald liegen sie isolirt, bald dicht neben oder unter einander, sind mehr oder weniger mit einander verwachsen, und wenn es auch oft leicht ersichtlich ist, dass eine Ansiedelung aus mehreren ursprünglich getrennten besteht, so ist es doch klar, dass eine solche Differenzirung nicht immer möglich ist.

Wie gross die dadurch bedingten der Methode zur Last fallenden Fehlergrenzen sind, das entzieht sich jeder Abschätzung.

Eine Untersuchung der gewöhnlich zum Giessen von Platten verwendeten Verdünnungsflüssigkeit lehrt auf den ersten Blick, dass selbst bei relativ grosser Verdünnung noch immer zahlreiche Keime so nahe aneinander gelagert sind, dass man keineswegs erwarten kann, aus ihnen isolirte Colonieen hervorgehen zu sehen.

¹ A. Reimsch, Zur bakteriologischen Untersuchung des Trinkwassers. *Centralblatt für Bakteriologie*. 1891. Bd. X. S. 415.

Aber auch die räumlich genügend weit entfernten Keime sind als solche durchaus nicht einheitlich.

Selbst bei der besten Mischung und einer noch so weit getriebenen Verdünnung finden sich bei allen Bakterien und vorzugsweise bei besonderen Arten derselben die Einzelindividuen nur zu einem Theile isolirt, während sie zu einem anderen Theile grössere und kleinere Verbände darstellen, die ein Multiplum von einzelnen Keimen enthalten.

Auch die Uebertragung der Bakterien von einem Nährboden in den anderen, sowie die Temperatur sowohl bei der Einsaat als auch während der Züchtung setzen für wechselnde Bakterienformen gewiss Verschiedenheiten, deren Einfluss Schwankungen von unbekannter Breite für das schliessliche Resultat ergeben muss.

Endlich bleibt beim Giessen der Platten in den zu diesem Zwecke verwendeten Eprouvetten stets ein gewisser Theil der zur Aussaat bestimmten Flüssigkeit zurück, ein Fehler, der gleichfalls nicht zu unterschätzen ist. Er beträgt nach meinen an Spülungsplatten angestellten Untersuchungen bis zu 5 Procent.

Das Bedenklichste sämmtlicher angeführter Fehlerquellen liegt jedoch in dem Umstande, dass alle ihren Ausschlag nach derselben negativen Richtung geben, sich also nicht gegenseitig ausgleichen können, sondern mit einander summiren müssen.

Aus diesen Gründen erschien es nothwendig, die Plattenzählung, welche fast den Werth einer quantitativen Methode beansprucht, an der Hand eines anderen Verfahrens zu controliren, dem diese Fehlerquellen nicht anhaften und eventuell dieses an Stelle derselben zu setzen.

Die Wägung der Bakterien oder die Messung derselben z. B. durch Centrifugiren kam, abgesehen von anderen Gründen, schon deshalb nicht in Betracht, weil nachträglich erst recht eine Aichung der erhaltenen Resultate nach der Plattenmethode nothwendig wäre, um nicht nur relative Werthe zu erhalten.

Dagegen erschien es zweckmässig, eine schon lange in der klinischen Medicin, in neuerer Zeit auch in der Botanik mit gutem Erfolge verwendete Methode zu berücksichtigen, nämlich die Zählung mittels der von Thoma-Zeiss construirten Kammer. In der Bakteriologie hat dieselbe bis jetzt keine methodische Anwendung gefunden, obwohl von manchen Autoren, z. B. von Hueppe,¹ Lafar² und anderen auf sie verwiesen wird.

¹ Hueppe, *Bakterienforschung*. Wiesbaden 1891. S. 309.

² Fr. Lafar, *Technische Mykologie*. Jena 1897. S. 115.

Vergleichende Untersuchungen, inwieweit dieselbe brauchbare Resultate giebt, liegen indessen von keiner Seite vor. Offenbar ist man vor der Schwierigkeit zurückgeschreckt, welche das Erkennen und Abzählen kleinster mikroskopischer Objecte, wie es eben die Bakterien sind, bietet und dies umsomehr, als in Folge der Tiefe der Thoma-Zeiss'schen Kammer und der Dicke des Deckglases nicht die stärksten der uns zur Verfügung stehenden Linsensysteme zur Beobachtung gebraucht werden können.

Die vorliegenden Untersuchungen sollen nun in systematischer Weise feststellen, ob die Kammerzählung der Bakterien überhaupt durchführbar ist, ob sie mit dem Plattenverfahren vergleichbare Resultate liefert und welche Vor- bzw. Nachtheile sie diesem gegenüber besitzt.

Eine genaue Beschreibung der Zählkammer von Thoma-Zeiss findet sich in jedem Lehrbuche der klinischen Untersuchungsmethoden, ebenso Angaben über die Art und Weise, wie die Kammer beschickt und wie gezählt werden soll.

Bei der Zählung von Bakterien ist auf folgende Punkte eine besondere Aufmerksamkeit zu richten: Die Reinigung der Kammer hat unmittelbar vor und nach jedesmaligem Gebrauche zu geschehen. Dabei hat sich nachstehendes Verfahren am besten bewährt:

1. Abspülen mit Sublimat (1:2000) und Abtrocknen mittels Hirschlederlappens;
2. Abspülen mit destillirtem Wasser;
3. Abspülen mit 60 procent. und absolutem Alkohol;
4. Abspülen mit Aether;
5. Durchziehen durch die Flamme bis zu völligem Trocknen.

Dieselbe Procedur muss gleich sorgfältig mit dem Deckglase vorgenommen werden. Dasselbe wird zweckmässig ziemlich dünn gewählt. Es muss stets so dicht aufgelegt werden, dass die Newton'schen Farbenringe vollständig deutlich sichtbar sind.

Als Verdünnungsflüssigkeit dient frisch destillirtes, ganz keimfreies Wasser. Auch abgetödtete Mikroorganismen dürfen in demselben nicht vorhanden sein.

Ist die Kammer in der angegebenen Weise gereinigt und mit destillirtem Wasser beschickt worden, so dürfen keine mit Bakterien zu wechselnde Objecte beobachtet werden.

Die Verdünnung geschieht am besten in Kochkölbchen von verschiedener Grösse, in denen auch eine genaue Mischung ohne Gefahr eines Verlustes vorgenommen werden kann.

Zur Durchmusterung der Kammer bediente ich mich eines Objectivs D und eines Oculars IV von Zeiss.

Um bei dieser Vergrößerung mit hinlänglicher Genauigkeit zu untersuchen, ist eine gewisse Einübung erforderlich. Im Anfange wurden fast immer zu geringe Zahlen gewonnen. Doch erlangte man bald die nöthige Sicherheit.

Die Zählung darf stets erst dann begonnen werden, wenn sich alle Keime auf dem Boden der Kammer abgelagert haben.

Bewegliche Bakterien müssen überdies zur Ruhe gekommen sein oder dürfen nur noch geringe Locomotionen erfahren, was gewöhnlich nach ca. 15 Minuten der Fall ist.

Bei der Durchprüfung der einzelnen Quadrate der Kammer werden die zu Zählenden in die Mitte des Gesichtsfeldes gebracht. Um eine leichte und sichere Verschiebung zu ermöglichen, genügt es, die untere Fläche des Objectträgers mit etwas Vaseline zu bestreichen. Man kann dann jede beliebige Stelle mit vollkommener Genauigkeit leicht einstellen.

Die Berechnung geschieht in einfacher Weise nach der Formel $x = \frac{n}{y} \cdot 250000$, die sich ohne Weiteres aus der Construction der Kammer ergibt. Dabei bedeutet x die in 1 ^{cem} der Zählflüssigkeit enthaltene Keimmenge, n die Anzahl aller gezählten Keime, y die Summe der durchgezählten grossen Quadrate, deren die Kammer im Ganzen 16 enthält.

Die Durchführbarkeit der Kammerzählung der Bakterien hängt in erster Linie davon ab, inwieweit die aus einzelnen Kammern erhaltenen Resultate mit einander übereinstimmen und wie viele Kammern, bezw. Quadrate gezählt werden müssen, um ein verlässliches Ergebniss zu erlangen.

Dies mögen folgende Versuche veranschaulichen.

I. Aufschwemmung von *Staphylococcus aureus*.
10 fache Verdünnung.

a)	63	75	70	82
	63	95	89	70
	73	67	87	73
	71	73	92	80
<hr/>				
	270	+ 310	+ 338	+ 305 = 1223.
b)	84	92	77	80
	72	81	95	73
	61	73	58	86
	70	85	87	90
<hr/>				
	287	+ 331	+ 317	+ 329 = 1264.

c)	92	64	61	76
	75	72	75	85
	86	68	83	62
	73	79	71	80
<hr/>				
	326 + 283 + 290 + 303 = 1202.			

Mittelwerth (berechnetes Mittel aus allen Beobachtungen) = 1229.6.

Absolute und Procent-Abweichungen vom Mittelwerth:

a) 1223	}	— 6.6	— 0.5 Procent,
b) 1264		1229.6 + 34.4	+ 2.8 „
c) 1202		— 27.6	— 2.1 „

Mittlere Abweichung vom Mittelwerthe (Mittel aus den Procent-Abweichungen) = 1.8 Procent. Grösste Procent-Abweichung zweier Werthe = 3.3 Procent.

a, b und c stellen das Resultat je einer ganzen Kammerzählung dar. Jede einzelne Zahl bedeutet die Summe der in einem grossen Quadrate bestimmten Keime. Dasselbe gilt von den folgenden Versuchen.

II. Aufschwemmung von *Staphylococcus aureus*. 10 fache Verdünnung.

a)	36	53	44	47
	37	48	38	46
	32	39	50	48
	42	31	49	54
<hr/>				
	147 + 171 + 181 + 195 = 694.			

b)	39	43	43	45
	52	37	41	48
	40	45	50	56
	41	48	36	59
<hr/>				
	172 + 173 + 170 + 208 = 723.			

c)	37	39	42	52
	41	57	42	53
	42	40	56	64
	46	46	48	45
<hr/>				
	166 + 182 + 188 + 214 = 750.			

d)	38	45	54	46
	38	51	48	43
	42	45	38	47
	53	51	49	56

$$171 + 192 + 189 + 192 = 744.$$

$$\text{Mittelwerth} = 727.75.$$

Absolute und Procent-Abweichungen vom Mittelwerthe:

a)	694	727.75	— 33.75	— 4.6 Procent,
b)	723		— 4.75	— 0.7 „
c)	750		+ 22.25	+ 3 „
d)	744		+ 16.25	+ 2.2 „

Mittlere Abweichung vom Mittelwerthe = 2.6 Procent.

Grösste Procent-Abweichung zweier Werthe = 7.6 Procent.

III. Aufschwemmung von Bacterium coli.

a)	23	21	23	28	b)	16	20	12	18
	23	21	19	26		18	20	18	22
	25	17	27	22		16	19	10	23
	20	23	17	22		21	15	17	23
<hr/>					<hr/>				
91 + 82 + 86 + 98 = 357.					71 + 74 + 57 + 86 = 288.				

c)	21	13	18	23
	20	23	14	21
	25	20	17	22
	16	25	16	18

$$82 + 81 + 65 + 84 = 312.$$

$$\text{Mittelwerth} = 319.$$

Absolute und Procent-Abweichungen vom Mittel:

a)	357	319	+ 38	+ 11.9 Procent,
b)	288		— 31	— 9.7 „
c)	312		— 7	— 2.2 „

Mittlere Abweichung vom Mittelwerth = 7.9 Procent.

Grösste Proc.-Abweichung zweier Werthe = 21.6 „

IV. Aufschwemmung von Milzbrand.

a)	6	7	8	3	b)	7	7	10	9
	2	5	7	7		5	3	3	8
	4	8	6	3		12	6	4	7
	4	9	4	3		8	8	4	9
<hr/>					<hr/>				
16 + 29 + 25 + 16 = 86.					32 + 24 + 21 + 33 = 110.				

Versuch	Mittelwerth	Mittl. Proc.-Abweichung
I	1229.6	1.8 Procent
II	727.75	2.6 „
III	319	7.9 „
IV	108	13.6 „
V	37	19.9 „

Bei der mikroskopischen Plattenzählung beträgt nach M. Neisser der mittlere Zählungsfehler unter günstigen Verhältnissen $\pm \frac{1}{7} - \frac{1}{8}$, also ca. 12 bis 14 Procent.

Derselbe ist also keineswegs geringer als bei der Kammerzählung und kann nicht wie bei dieser durch eine dichtere Aussaat weiter herabgedrückt werden. Während 5 bis 10 Keime in einem kleinen Quadrat der Kammer gewöhnlich noch gut zählbar sind, ergeben Platten, die mit nur $\frac{1}{10}^{\text{cem}}$ einer Flüssigkeit, in welcher die Mikroorganismen so dicht gelagert sind, gegossen werden, ausnahmslos entweder ganz unbrauchbare Werthe oder sie sind überhaupt nicht zählbar.

Für die Methode der Kammerzählung ergibt sich aus den angeführten Verhältnissen die Regel, die Zählung bei möglichst dichter Beschickung der Kammer vorzunehmen.

Zählt man eine Kammer vollständig durch, so wird der Zählungsfehler im Allgemeinen erträglich sein. Zweckmässiger ist es vielleicht, in zwei Kammern den Bakteriengehalt von je 8 grossen Quadraten zu bestimmen.

Neben dem durch die Zählung als solcher bedingten Fehler kommen die durch die Verdünnung gesetzten Abweichungen vom wahren Werthe in Betracht. Die Verdünnungsfehler werden natürlicher Weise um so grösser sein, je grösser die gewählte Verdünnung ist. Wie weit man mit derselben gehen kann, ohne die zulässigen Grenzen zu überschreiten, zeigen die folgenden Beispiele. In denselben sind die mittleren Procent-Abweichungen der Resultate ohne Rücksicht auf den Zählungsfehler dargestellt.

I. Aufschwemmung von *Staphylococcus pyogenes aureus*.
Drei Verdünnungen im Verhältniss 1:10:100.

Verdünnung	Gefunden	Berechnet	Proc. Abweichung
a) 10 fach	696	697	— 0.1
b) 100 fach	68	69.7	— 2.4
c) 1000 fach	10	6.79	+ 43.4

Die Verdünnung a wurde hergestellt durch Mischen von 0.5^{cem} der ursprünglichen Aufschwemmung mit 4.5^{cem} Wasser.

0.5^{cem} der Verdünnung a + 4.5^{cem} Wasser geben dann die Verdünnung b und von dieser wieder 0.5^{cem} + 4.5^{cem} Wasser die Verdünnung c. So oder ähnlich wurde auch bei den folgenden Versuchen verfahren.

II. Aufschwemmung von *Staphylococcus pyogenes aureus*.
3 Verdünnungen im Verhältniss 1:10:100.

	Verdünnung	Gefunden	Berechnet	Proc. Abweichung
a)	10 fach	2560	2575	— 0.5
b)	100 „	273	257.5	+ 6
c)	1000 „	25	25.75	— 2.9

III. Aufschwemmung von *Bacillus Friedländer*.
3 Verdünnungen im Verhältniss 1:5:25.

	Verdünnung	Gefunden	Berechnet	Proc. Abweichung
a)	5 fach	211	214.5	— 1.6
b)	25 „	45	42.9	+ 4.9
c)	125 „	10	8.58	+ 16.5

IV. Aufschwemmung von *Bacillus coli*.
3 Verdünnungen im Verhältniss 1:5:25.

	Verdünnung	Gefunden	Berechnet	Proc. Abweichung
a)	5 fach	1044	1071.75	— 2.5
b)	25 „	240	214.35	+ 12
c)	125 „	45	42.87	+ 5

V. Aufschwemmung von *Bacillus pyocyaneus*.
3 Verdünnungen im Verhältniss 1:10:100.

	Verdünnung	Gefunden	Berechnet	Proc. Abweichung
a)	10 fach	438	438	0
b)	100 „	42	43.8	— 4.1
c)	1000 „	6	4.38	+ 37

Diese Beispiele zeigen, dass mit wachsender Verdünnung der Verdünnungsfehler grösser wird und dass die Procent-Abweichung erst dann so bedeutend ist, dass verwerthbare Resultate nicht erwartet werden können, wenn in einer ganzen Kammer weniger als 20 Keime vorhanden sind.

Bei grösserer Verdünnung liegt der Fehler beinahe immer in positiver Richtung. Die Ursache dieser fast constanten Erscheinung liegt vielleicht darin, dass die Bakterienverbände stärker gelöst werden.

Es ergibt sich also auch aus dieser Betrachtung die schon oben aufgestellte Forderung, die Kammerzählung bei möglichst geringer Verdünnung vorzunehmen.

Die folgenden Experimente enthalten vergleichende Bestimmungen, die einmal durch die Kammerzählung, das andere Mal durch mikroskopische Plattenzählung gewonnen wurden. Zur Verwendung gelangten entweder Aufschwemmungen frischer, höchstens 24 stündiger Agar-Culturen oder Bouillon-Culturen.

Die Agarplatten wurden in Petri-Schalen gegossen, bei 37° im Brutofen gehalten und in 24 stündigen Intervallen gezählt, so lange, bis keine Zunahme oder bereits eine Abnahme der Colonieen erfolgte.

I. *Staphylococcus pyogenes aureus*, 24 stündige Bouilloncultur.
2 Tropfen in 100^{cem} Wasser.

Von dieser Verdünnung sind in 1^{cem} enthalten:

$$\text{Kammer} \left(\frac{28}{4 \times 16} \right) = 109\,375.$$

$$\text{Platte} \cdot \left(\frac{309}{32} \right) = 84\,050.$$

$$\text{Abweichung} = - 23 \text{ Procent.}$$

Die als Plattenzahl angesetzte Ziffer ist das Mittel aus 2 Bestimmungen. Es wurden mit je 0.5^{cem} 2 Platten gegossen, von welchen die eine nach 24 Stunden 20900, nach 48 Stunden 73600, die andere nach 24 Stunden 52054, nach 48 Stunden 94500 Colonieen auf 1^{cem} der Aussaat berechnet enthielt.

Die in Klammern stehenden Zahlen bedeuten hier und in den weiteren Versuchen im Zähler die Summe aller gezählten Keime bzw. aller Colonieen, im Nenner die Zahl der gezählten grossen Quadrate bzw. der gezählten Gesichtsfelder.

II. *Staphylococcus pyogenes aureus*, 24 stündige Bouilloncultur.
3 Tropfen in 50^{cem} Wasser.

1^{cem} dieser Verdünnung enthält:

$$\text{Kammer} \quad . \quad . \quad . \quad \left(\frac{108 \cdot 75}{16} \right) = 1\,700\,000$$

$$\text{Platte mit } 0.5 \text{ cem} \left(\frac{2263}{32} \right) = 501\,000$$

$$\text{Abweichung} = - 70.5 \text{ Procent.}$$

Die Kammerzahl ist das Mittel aus vier Bestimmungen mit einer mittleren Abweichung von 11 Procent.

III. *Staphylococcus pyogenes aureus*, 24 stünd. Bouilloncultur.
3 Verdünnungen: a) 10fach, b) 100fach, c) 1000fach.

$$\text{a) Kammer } \left(\frac{696}{16} \right) = 10\,875\,000$$

Platte mit 1^{cem} nicht zählbar.

$$\text{b) Kammer } \left(\frac{68}{16} \right) = 10\,620\,000$$

Platte mit 1^{cem} nicht zählbar.

$$\text{c) Kammer } \left(\frac{10}{16} \right) = 15\,600\,000$$

$$\text{Platte mit 1}^{\text{cem}} \left(\frac{570}{32} \right) = 6\,300\,000.$$

Abweichung der Platte c von der Kammer a = — 42 Procent.

IV. *Staphylococcus pyogenes aureus*, 24 stünd. Bouilloncultur.
3 Verdünnungen: a) 10fach, b) 100fach, c) 1000fach.

1^{cem} der ursprünglichen Bouillon enthält nach:

$$\text{a) Kammer} \quad . \quad . \quad \left(\frac{680}{16} \right) = 10\,625\,000$$

$$\text{Platte mit 1}^{\text{cem}} \left(\frac{590}{32} \right) = 589\,000$$

Abweichung = — 94 Procent.

$$\text{b) Kammer} \quad . \quad . \quad \left(\frac{69}{16} \right) = 10\,780\,000$$

$$\text{Platte mit 1}^{\text{cem}} \left(\frac{70}{32} \right) = 662\,000$$

Abweichung = — 93 Procent.

$$\text{c) Kammer} \quad . \quad . \quad \left(\frac{8}{16} \right) = 12\,500\,000.$$

Platte mikroskopisch wegen zu geringer Dichte der Colonieen nicht zählbar.

V. *Bacillus Friedländer*, 24 stündige Bouilloncultur. 3 Verdünnungen: a) 10fach, b) 100fach, c) 1000fach.

1^{cem} der ursprünglichen Bouillon enthält nach:

$$\text{a) Kammer} \quad . \quad . \quad \left(\frac{388}{16} \right) = 6\,063\,000$$

Platte mit 0.25^{cem} unzählbar.

$$\text{b) Kammer} \quad . \quad . \quad \left(\frac{39}{16} \right) = 6\,090\,000$$

Platte mit 0.25^{cem} = 1 810 000.

Abweichung gegen Kammer a = — 70 Procent.

$$c) \text{ Kammer} \cdot \cdot \left(\frac{5}{16} \right) = 7\,800\,000$$

Platte mit 0.25^{cem} wegen schlechter Vertheilung nicht zählbar.

Das Gemeinsame dieser vergleichenden, aus einer Reihe gleichartiger herausgegriffener Untersuchungen liegt darin, dass das durch die Zählung der Kammer gewonnene Resultat constant das durch die mikroskopische Plattenzählung ermittelte bei Weitem überragt. Die Differenzen bewegen sich zwischen 23 und 94 Procent, sind also mitunter so gross, dass sie ernste Bedenken gegen die Methode der Plattenzählung wachrufen müssten, falls sie derselben allein zuzuschreiben wären.

Da sich aber die letztere ausschliesslich auf die Bestimmung der lebensfähigen Keime unter der Voraussetzung ihrer Fortpflanzungsfähigkeit beschränkt, so ist die Vorstellung nahe liegend, die Differenz der Resultate beider Methoden sei in dem Umstande gelegen, dass bei der Kammerzählung ausnahmslos alle Keime, ob todte oder lebende, in Rechnung gebracht würden.

In demselben Verhältnisse, wie nun in der Aussaat die lebenden zu den abgestorbenen Keimen stünden, müssten die Ergebnisse der Kammer- und Plattenzählung einander abweichen.

Um diesen wichtigen Einwand zu prüfen, stand nur das eine Mittel zu Gebote, nachweisbar lebende Mikroorganismen zur Zählung einerseits und zur Aussaat andererseits zu verwenden.

Das einzige sichere Kriterium, um das Leben der Spaltpilze zu erkennen, ist neben ihrer Vermehrungsfähigkeit die wenigstens einzelnen Arten zukommende Eigenbewegung.

Gelang es, nachzuweisen, dass in der Saefflüssigkeit mehr bewegliche Keime vorhanden sind, als bei der entsprechenden Platte Colonien aufgehen, so war dieser Einwand zu Ungunsten der letzteren Methode entschieden. Zu diesem Zwecke wurden folgende Versuche ausgeführt.

I. Typhus, 24stündige Bouilloneultur.

Verdünnung von 1:100.

Die Zählung der Kammer ist Anfangs wegen allzu lebhafter Bewegung der einzelnen Bacillen nicht möglich. Nach 20 Minuten ist ungefähr die Hälfte der Keime noch deutlich, wenn auch schon [träge beweglich. Es wurden nun in drei Kammern die beweglichen und die gesammten Keime gezählt. Die erhaltenen Werthe stimmen sowohl absolut, als auch relativ ziemlich gut überein. Es enthielt:

Kammer I	97 Keime, darunter 43 bewegliche,
„ II	109 „ „ 42 „
„ III	93 „ „ 30 „

1 ^{cem} der Verdünnungsflüssigkeit enthielt also im Mittel 1 557 500 Keime, darunter 600 000 bewegliche.

Mit 0.5 ^{cem} der Verdünnungsflüssigkeit wurden gegossen Platte A und drei Platten B.

Platte A enthält, auf 1 ^{cem} berechnet:

$$\left(\frac{3195}{32}\right) = 780\,000 \text{ Colonieen.}$$

Die Platten B enthalten ebenfalls in 1 ^{cem}:

Platte B	I	324 000 Colonieen,	
„	B II	463 000	„
„	B III	218 000	„

Zusammen also: 1 005 000 Colonieen.

Demnach enthielt Platte A um 30 Procent mehr Colonieen, als bewegliche Keime gezählt wurden, aber um 50 Procent weniger, als die Summe der ruhenden und beweglichen Keime betrug.

Daraus geht nur hervor, dass nicht alle ruhenden Keime lebensunfähig sind; für die sichere Entscheidung unserer Frage ist jedoch dieser Versuch nicht verwerthbar.

Die mit derselben Aussaat angelegten Platten B, bei welchen die Keime in einem grösseren Raume zur Vertheilung kamen, enthalten um 29 Procent mehr Colonieen als Platte A und nur um 35 Procent weniger Colonieen, als die Kammer an ruhenden und beweglichen Keimen ergab.

Dieses Verhalten weist darauf hin, dass die Differenz bei der Plattenzählung wenigstens zu einem grösseren Theile auf eine zu dichte Lagerung der einzelnen Keime zurückzuführen ist, auch wenn sich ihre Menge, bezw. die der entstandenen Colonieen in den bisher als zulässig geltenden Grenzen bewegt.

II. *Pyocyaneus*, 18stündige Bouilloncultur. 100fache Verdünnung.

Die Bacillen sind fast ausnahmslos sehr lebhaft beweglich. Nach Constatirung dieses Verhaltens in der Brutkammer bei 31° C. wird die Zählkammer bei gewöhnlicher Zimmertemperatur durch 20 Minuten belassen und sodann untersucht. Die Bacillen haben ihre Beweglichkeit nunmehr entweder gänzlich verloren, oder es bereitet dieselbe der Zählung keine weiteren Schwierigkeiten, da die Locomotionen nur noch geringe sind.

1 ^{cem} der Verdünnung enthält:

$$\text{Kammer } \left(\frac{235}{16}\right) = 3\,672\,000.$$

Platte A mit 0.5^{ccm} der Verdünnung $\left(\frac{4563}{32}\right) = 1\,112\,000$.

Platte BI + BII + BIII + BIV + BV zusammen mit ebenfalls 0.5^{ccm}:

$$\left(\frac{2444}{32}, \frac{1720}{32}, \frac{2239}{32}, \frac{1048}{32}, \frac{814}{32}\right) = 2\,121\,000.$$

Trotzdem also in diesem Versuche fast ausnahmslos lebende Keime zur Aussaat gelangten, bleibt die Platte A um 69.7 Procent hinter der Zählkammer zurück. Bei den Platten B sinkt diese Differenz auf 42 Proc., wobei die in denselben enthaltene Anzahl von Colonieen um 47 Procent steigt, obwohl dieselbe Flüssigkeitsmenge zur Aussaat verwendet wurde.

5 Gelatineplatten, die zusammen ebenfalls mit 0.5^{ccm} der Verdünnungsflüssigkeit beschickt wurden, enthielten nach 48 Stunden 2053000 Colonieen, ein mit dem durch Zählung der Agarplatten nach 24 Stunden gewonnenen Werthe gut übereinstimmendes Resultat.

III. *Pyocyaneus*, 14stündige Bouilloncultur, enthält nur bewegliche Keime. Verdünnung 1:600.

1^{ccm} der ursprünglichen Bouillon enthält:

$$\text{Kammer} \dots \dots \left(\frac{86}{16}\right) = 750\,000\,000.$$

$$\text{Agarplatte mit 0.5}^{\text{ccm}} \left(\frac{1858}{32}\right) = 223\,000\,000$$

$$\text{„ „ „} \left(\frac{1149}{32}\right) = 219\,000\,000$$

$$\text{„ „ „} \left(\frac{1348}{32}\right) = 203\,100\,000$$

$$\text{„ „ „} \left(\frac{1295}{32}\right) = 194\,000\,000.$$

Die Resultate der einzelnen, gleich beschickten Platten stimmen ziemlich gut unter einander überein. Die mittlere Abweichung derselben gegenüber der Kammer = — 72 Procent.

IV. *Pyocyaneus*, 18stündige Bouilloncultur, fast ausnahmslos bewegliche Keime. Verdünnung 1:144.

1^{ccm} der ursprünglichen Bouillon enthält:

$$\text{Kammer} \dots \dots \left(\frac{584}{8}\right) = 2\,300\,000\,000.$$

Agarplatten:

$$\text{I mit 0.5}^{\text{ccm}} \left(\frac{16\,888}{32}\right) = 590\,000\,000$$

$$\text{II „ 0.1 „} \left(\frac{6753}{32}\right) = 1\,182\,000\,000$$

$$\text{III mit } 0.05 \text{ ccm } \left(\frac{3541}{32} \right) = 1\,240\,000\,000$$

$$\text{IV „ } 0.01 \text{ „ } \left(\frac{707}{32} \right) = 1\,270\,000\,000.$$

Die Abweichung der Plattenwerthe von dem Kammerwerthe beträgt bei I = — 74 Procent, bei IV = — 44 Procent. Sie ist im Allgemeinen um so kleiner, je weniger dicht die Platten bestanden sind.

V. *Bacillus coli*, 24stündige Bouilloncultur.
Verdünnung 1:200.

1 ccm der ursprünglichen Bouillon enthält:

$$\text{Kammer . . . } \left(\frac{250}{16} \right) = 781\,000\,000.$$

Agarplatten: a) Verdünnung 1:200.

$$\text{I mit } 0.2 \text{ ccm } \left(\frac{3455}{32} \right) = 431\,000\,000$$

$$\text{II „ } 0.1 \text{ „ } \left(\frac{1922}{32} \right) = 469\,000\,000.$$

b) Verdünnung 1:24 000.

$$\text{III mit } 0.5 \text{ ccm } \left(\frac{101}{32} \right) = 579\,000\,000$$

$$\text{IV „ } 0.2 \text{ „ } \left(\frac{56}{32} \right) = 650\,000\,000$$

$$\text{V „ } 0.1 \text{ „ } \left(\frac{32}{32} \right) = 892\,000\,000.$$

Auch in diesem Experimente waren so gut wie alle Keime beweglich. Die Platten zeigen mit dem Kleinerwerden der Aussaat eine Verminderung der Abweichung vom Kammerwerthe von — 44.5 Procent bei Platte I bis auf — 16.7 Procent bei IV. Platte V giebt sogar eine Abweichung von 14 Procent in positiver Richtung.

Jedoch ist bei IV und V die Verdünnung schon so weit getrieben, dass die Resultate dieser Zählungen kaum noch Berücksichtigung verdienen.

Die angeführten Versuche lassen wohl klar erkennen, dass die grosse und constant in negativer Richtung liegende Differenz zwischen Platten- und Kammerzählung auch dort vorhanden ist, wo nur lebendes Material zur Aussaat kommt. Sie lehren gleichzeitig, dass dieselbe wenigstens zu einem grossen Theile mit der Dichte der Aussaat in Zusammenhang gebracht werden muss. Inwieweit an derselben andere Versuchsfehler, wie geringe Abweichungen vom Optimum des Nährbodens oder der Temperatur u. s. w., Theil haben, lässt sich bei der einzelnen Beobachtung

nur schwer feststellen. Dass aber der Einfluss dieser und anderer Momente ein ganz wesentlicher sein kann, ist eine sattsam bekannte und durch specielle Versuchsführungen erhärtete Thatsache.

Im Folgenden erscheinen noch einige andere, an verschiedenen Spaltpilzen gewonnene Versuche angeschlossen, die im Wesentlichen mit den vorausgehenden übereinstimmen.

VI. *Bacillus subtilis*, 24stündige Bouilloncultur.

Kammer unverdünnt $\left(\frac{1393}{16}\right) = 21\,750\,000$.

Agarplatten: Verdünnung 1:54.

I. mit 0.5 ^{ccm} $\left(\frac{59}{32}\right) = 777\,000$

II. „ 0.2 „ $\left(\frac{27}{32}\right) = 868\,000$

III. „ 0.1 „ $\left(\frac{12}{32}\right) = 790\,000$

Mittlere Abweichung = — 97 Procent.

Die Colonieen in den Platten bilden nicht scharf umschriebene Ansiedelungen, sondern bestehen aus einem dichteren Kerne, von dem ein weit in die Umgebung reichendes, oft das ganze Gesichtsfeld ausfüllendes Fadenwerk ausgeht.

In der Zählkammer sind neben einzelnen Gliedern lange, 10 und mehr Individuen zusammenfassende Fäden vorhanden.

Diese werden ebenso wie in allen übrigen Versuchen grössere und kleinere Häufchen, Rasen, Ketten oder Zusammenlegungen anderer Art immer nur als 1 gerechnet.

VII. *Bacillus subtilis*, 16 stündige Bouilloncultur.

Alle Keime beweglich.

Kammer, Verdünnung 1:10 $\left(\frac{78}{16}\right) = 12\,250\,000$.

Agarplatten derselben Verdünnung mit 0.5, 0.2 und 0.1 ^{ccm} sämtlich unzählbar. Agarplatten, Verdünnung 1:36, mit 0.5 und 0.2 ^{ccm} unzählbar, mit 0.1 ^{ccm} = 3 597 000. Abweichung = — 70 Procent.

VIII. *Bacillus anthracis*, 24stündige Bouilloncultur.

1 ^{ccm} der ursprünglichen Bouillon enthält:

Kammer unverdünnt $\left(\frac{108}{16}\right) = 10\,688\,000$.

Platten mit 0.5, 0.2 und 0.1 ^{ccm} bei 10 facher Verdünnung unzählbar.

Agarplatten: Verdünnung 1:100.

$$\text{I. mit } 0.5 \text{ ccm } \left(\frac{55}{32} \right) = 1\,310\,000$$

$$\text{II. „ } 0.2 \text{ „ } \left(\frac{34}{32} \right) = 1\,974\,000$$

$$\text{III. „ } 0.1 \text{ „ } \left(\frac{23}{32} \right) = 2\,804\,000.$$

Mittlere Abweichung = —80.9 Procent.

IX. *Bacillus anthracis*, 24stündige Bouilloncultur.

1 ccm der ursprünglichen Bouillon enthält:

Kammer 10fache Verdünnung = 14 270 000,

Platten „ „ = unzählbar.

Agarplatten 100fache Verdünnung:

$$\text{I. mit } 0.5 \text{ ccm} = 2\,100\,000.$$

$$\text{II. „ } 0.2 \text{ „} = 2\,340\,000.$$

$$\text{III. „ } 0.1 \text{ „} = 3\,150\,000.$$

Mittlere Abweichung = —82 Procent.

Der Bau der einzelnen Colonieen bei den Heu- und Milzbrandbacillen, sowie die bedeutende Grösse, welche dieselben erreichen, setzt für die Zählung und Differenzirung derselben gewiss sehr ungünstige Bedingungen.

X. *Vibrio cholerae asiaticae*, 24stündige Bouilloncultur.

1 ccm der Bouillon enthält:

$$\text{Kammer 10fache Verdünnung} \dots \left(\frac{511}{12} \right) = 106\,457\,000.$$

$$\text{Agarplatten 100fache Verdünnung mit } 0.5 \text{ ccm } \left(\frac{452}{32} \right) = 14\,804\,000.$$

Abweichung = —86 Procent.

Die angeführten Beispiele könnten noch durch eine grosse Reihe anderer ähnlicher bereichert werden.

Sie alle zeigen, dass die Kammerzählung constant bei Weitem höhere Werthe liefert als die Plattenzählung, auch dann, wenn dieselbe mikroskopisch vorgenommen und nur lebende Zellen ausgesät werden.

Die Differenzen sind mitunter so gross, dass der Werth der Platten-Zählmethode völlig in Frage gestellt wird. Eine quantitative Mengenbestimmung der Bakterien ist mittels der Plattenzählung gewiss illusorisch. Dabei kommt noch der Umstand in Betracht, dass es sich bei den vorliegenden Untersuchungen immer nur um Reinculturplatten gehandelt hat. Bei Gemischplatten liegen die Verhältnisse ja noch viel complicirter.

Trotzdem kann die Methode der Kammerzählung in praktischer Hinsicht nicht an Stelle der bisher üblichen gesetzt werden. Denn wenn wir auch im Experimente die Bedingungen so wählen können, dass der Einwand der todtten Keime ausgeschaltet wird, so sind wir das den Problemen der praktischen Hygiene gegenüber keineswegs im Stande.

Wir können nie mit nur annähernder Sicherheit bestimmen, wie viel von den in einer Kammer gezählten Keimen noch lebend und fortpflanzungsfähig sind und würden deshalb nicht über eindeutige Resultate verfügen. Bei verunreinigten Prüfungsobjecten wird es überdies unmöglich sein, kleinste Partikelchen anderer Art scharf genug von Mikroorganismen zu unterscheiden.

Dagegen dürfte die Methode der Kammerzählung für viele Aufgaben der wissenschaftlichen Forschung den Vorzug verdienen. Namentlich die Untersuchungen über die Vermehrungsgeschwindigkeit der Bakterien, sowie über den Einfluss hemmender oder fördernder Umstände auf dieselbe, werden auf diesem Wege exacter durchgeführt werden können.

Eine quantitative Methode zu sein, darf aber auch die Kammerzählung der Bakterien nicht beanspruchen. Auch sie giebt im Allgemeinen zu geringe Werthe, da sowohl die Kokken als auch die Stäbchen, Schrauben u. s. w. nur selten isolirt sind, meist hingegen auch bei der sorgfältigsten Mischung und bei weitest gehender Verdünnung Verbindungen von mehr als einem Individuum darstellen. Als Einzelwesen wurden in meinen Untersuchungen, wie schon erwähnt, immer nur sicher von einander getrennte Keime, Gruppen oder Reihen derselben gezählt.

Das Resultat der vorliegenden Untersuchungen ist in kurzer Zusammenfassung folgendes:

Die Kammerzählung ist als solche gut ausführbar. Sie liefert viel bessere Ergebnisse, als die mikroskopische Plattenzählung, die sie aber in praktischer Beziehung nicht zu ersetzen vermag. Für einzelne wissenschaftliche Probleme dürfte sie mit Vortheil angewendet werden. Als quantitative Methode ist auch sie nicht anzusehen.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden zu einem Theile in Gemeinschaft mit Hrn. Dr. Bondy, Secundärarzt im K. K. Rudolphspitale, ausgeführt, den jedoch äussere Umstände an der gänzlichen Durchführung derselben hinderten.