[Aus dem hygienischen Institut der Kgl. Universität Berlin.]

(Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. C. Flügge.)

Zur bakteriologischen Wasseruntersuchung.

I. Mitteilung.

Der Nachweis von Bakterien durch das Berkefeldfilter.

Von

Prof. M. Ficker.

Der Gedanke, die Bakterien aus einer Suspension durch Abfiltrieren zu gewinnen und sie damit der näheren Prüfung zugänglicher zu machen, hat schon mehrere Forscher beschäftigt. Nahegelegt wurde dieser Gedanke einmal durch das im großen und ganzen grundsätzlich gleiche Vorgehen des Chemikers, der feinste Niederschläge auf dem Filter sammelt, um sie dann quantitativ und qualitativ zu untersuchen, ferner durch die Beobachtungen an natürlichen und künstlichen Filtern, nach denen die für die Zurückhaltung der Mikroorganismen maßgebenden Schichten eines Filters die oberflächlichen sind, so daß nun die Aufgabe bestand, die abgefangenen Bakterien aus diesen Filterschichten bei starren Filtern zu entfernen oder bei nichtstarren Filtern das Filtermaterial mit den zurückgehaltenen Bakterien auf Nährböden zur Aussaat zu bringen, ähnlich wie man es bei bakteriologischen Luftuntersuchungen mittels Sand- oder Glaskörnchen tut.

Als Filter sind benutzt worden: Chamberland-, Berkefeld- und Sandfilter. Die bekannt gegebenen Methoden sollten den Nachweis von Typhusbazillen im Wasser (Klein, Chantemesse: Berkefeld- und Chamberlandfilter) oder von Protozoen (Jackson: Sandfilter) oder von Tuberkelbazillen im homogenisierten Sputum (Nebel: Maßenkerze) erleichtern. Anzureihen wären hier auch die Methoden, bei denen nach vorheriger Fällung mit chemischen Mitteln (z. B. Eisensalzen) ein Abfiltrieren des

Niederschlag und Flüssigkeitsrestes erfolgte: bei dieser Filtration kommt dem Niederschlag, der den Filter überkleidet, ebenfalls eine filtrierende Wirkung zu (Müller, Nieter).

Der erste, der die Abfiltration von Keimen zum Zwecke ihres Nachweises benutzte, ist E. Klein gewesen: er leitete 1500 bis 2500^{cem} typhusverdächtigen Wassers durch Berkefeldfilter, schabte die Bakterien mit einer sterilen weichen Bürste von der Filteroberfläche, die seiner Meinung nach den größten Teil der Wasserbakterien enthielt, in 20^{cem} sterilen Wassers ab und benutzte die Mischung zur Plattenkultur (Karbolgelatine), einen Teil auch zur Vorkultur (Bouillon). In 14 derart untersuchten Wässern fand er einmal den Typhusbacillus.

Chantemesse filtrierte 6 Liter Wasser durch Chamberland-Pasteur-Filter; er nahm an, daß alle Bakterien an der äußeren Oberfläche zurückgehalten würden, wusch das Filter mit 200^{cem} 3 prozent. Peptonwassers ab, das nun bebrütet und nach bestimmten Gesichtspunkten (Lüftung, Ersatz der Nährflüssigkeit durch neue nach Absaugung durch Kerzen, Zentrifugieren, Aufbringen auf Karbolpeptonagar) weiterverarbeitet wurde. Die Mitteilung von Chantemesse, mit dieser Methode in jedem Falle im Seineswasser Typhusbazillen gefunden zu haben, ist starkem Zweifel begegnet.

Die genannten Verfahren haben sich keinen Eingang in die Laboratorien zu schaffen vermocht. Dazu hat wohl wesentlich die Unzuverlässigkeit der im Handel befindlichen Filtersorten beigetragen. Erst als durch eine neue Art der Einkittung (Innenkittung mit Gummipplattenverschluß) die Filter der Berkefeldgesellschaft, wie die Untersuchungen v. Wunschheims zeigten, vervollkommenet, und als die näheren Vorgänge des Filtrationsaktes bei diesem neuen Filtertyp durch eine Untersuchung P. Schmidts klargelegt worden waren, konnte das Verfahren von Klein wieder in Erinnerung gebracht werden: hatte P. Schmidt doch nachgewiesen, daß in der Tat die Bakterienfiltration „weniger durch physikalische Oberflächenadsorption als vielmehr durch direkte Verstopfung geschieht“, und daß „die Verstopfung nur ganz an der Oberfläche der Filterkerze stattfindet“. Nach Schmidt gelingt es, eine fast vollständige Reinigung der Kerzen auf mechanischem Wege durch rückläufige Spülung zu erreichen, ein Verfahren, das übrigens schon seit langem in verschiedenen Laboratorien gehandhabt wurde: wollte man nach Filtration eiweißhaltiger Medien (Serum o. dgl.) oder dichter Suspensionen die Filterkerzen reinigen, so schloß man sie an die Wasserleitung rückläufig an. (Hier sei übrigens bemerkt, daß die Berkefeldgesellschaft die Benutzung des Rückdruckes der Leitung zum Reinigen der Filterzylinder widerrät: die Filterkörper könnten wohl einen recht erheblichen äußeren Überdruck

aushalten, würden aber durch einen verhältnismäßig geringen inneren Überdruck zersprengt; die Anwendung eines höheren inneren Überdruckes als $\frac{1}{2}$ Atmosphäre sei unangebracht, bei 1 Atmosphäre sei jedenfalls größte Vorsicht geboten.)

Als dann P. Schmidt diese rückläufige Spülung zum Zweck der Reinigung mit einer Druckpumpe ausgeführt hatte, untersuchte E. Hesse, welche Quantitäten der aus einer Suspension abfiltrierten Keime durch rückläufige Spülung wieder zu gewinnen sind. Er fand, daß auf diesem Wege die auf der Kerzenoberfläche zurückgehaltenen Keime nahezu völlig entfernt werden können, und zwar erscheint die Hauptmenge der Keime schon mit 4 bis 5 Stößen der Druckpumpe. Auch bei sehr geringem Keimgehalt (unter 10 Keimen im Liter) bewährte sich die Methode, deren Anwendbarkeit für größere Volumina Wasser (10 Liter und mehr) durch eine automatische Vorrichtung erleichtert wurde. Hesse bevorzugte die Kerzen von 6^{cm} Länge und 2 $\frac{1}{2}$ ^{cm} Durchmesser, empfahl aber auch größere Kerzentypen mit gesteigerter Leistungsfähigkeit. Er versprach sich außerordentlich günstige praktische Erfolge bei Untersuchung von Brunnen- und Nutzwasser auf ihren Keimgehalt überhaupt wie auch auf Anwesenheit pathogener Keime. Im Durchschnitt konnte Hesse zunächst 42 Prozent der in die zu filtrierende Flüssigkeit eingesäten Bakterien wieder nachweisen. — Äußerst störend für die Weiterverbreitung der Methode war die Ungleichheit der Kerzen: sie mußten auf ihre Brauchbarkeit geprüft und ständig kontrolliert werden. In einer zweiten Arbeit konnte darauf Hesse mitteilen, daß nach Zusatz von Kieselgurpulver zu dem zu filtrierenden Wasser auch schlechte Kerzen gute Ergebnisse lieferten, die Filtration konnte dabei selbst unter höherem Druck vorgenommen werden (Anschluß von Kerzen direkt an die Leitung). Ein weiterer Vorteil der Anwendung des Kieselgurpulvers ist nach Hesse, daß schon der erste Stoß mit der Druckpumpe bei der rückläufigen Spülung fast sämtliche Keime entfernt; der Gurbelag auf den Plattenoberflächen beeinträchtigte die Übersichtlichkeit nicht, es trat eine Steigerung des Prozentsatzes der wiedergefundenen Keime von 42 auf 91 Proz. ein. Schließlich hat Hesse in einer dritten Arbeit noch vorgeschlagen, die Kieselgur schon vor der Bakterienfiltration auf den Kerzen niederzuschlagen, indem man das Gurpulver in sterilem Wasser aufschwemmt, in den das Filter umgebenden Glaszylinder füllt und nun absaugt. Die Zahl der wiedergefundenen Keime konnte damit auf 95 bis 96 Prozent erhöht werden.

Diese außerordentlich günstigen Resultate Hesses mußten zu einer Nachprüfung auffordern. Ich begann damit unmittelbar nach Erscheinen der ersten Arbeit Hesses. Da diese dann durch zwei weitere Mitteilungen

Hesses überholt wurde, habe ich mich mit den neueren Modifikationen am eingehendsten beschäftigt. Die früheren Versuche (Filtration ohne Gurzusatz) sind insofern nicht völlig wertlos geworden, als sie Gelegenheit gaben, die Methodik zu üben. Denn, das mag vorausgeschickt werden, das Verfahren ist nicht ganz so leicht zu handhaben, wie man bei der Lektüre der Arbeiten Hesses, der ja über die Erfahrung außerordentlich zahlreicher Versuche verfügt, annehmen könnte. Man muß auf eine ganze Reihe von Schwierigkeiten gefaßt sein. Obwohl ich mich ganz nach den Vorschriften Hesses richtete, ergaben meine ersten Versuche mit der ursprünglichen Methode (Filtration ohne Zusatz von Pulver) ungenügende Resultate. Es wäre zwecklos, hier diese Versuche wiederzugeben oder Mittelzahlen für die wiedergefundenen Keimzahlen anzuführen: es sind Versuche dabei, die sicherlich wegen mangelnder Übung in der Versuchstechnik auszuschalten wären. So boten sich zunächst erhebliche Schwierigkeiten bei der Ablösung der abgefangenen Keime von dem Filter durch den Rückstoß der Druckpumpe. Es konnte durchaus nicht immer mit dem ersten oder zweiten Rückstoß der größere Teil der Keime abgedrückt werden, das gelang nur bei einigen Filtern. Die einzelnen Filter haben einen sehr verschiedenen Widerstand, man hat es infolgedessen nicht immer in der Hand, die Kraft und die Zeitdauer des Rückstoßes so zu wählen, daß eine gleichmäßige Ablösung erfolgt und vor allem, daß das geeignete Quantum Rückstoßflüssigkeit auf die Platten kommt. Hesse selbst ist dieser Schwierigkeit wegen zunächst wieder davon abgekommen, die Rückspülflüssigkeit auf Plattenoberflächen aufzubringen, er gab sie vielmehr in der Menge von 10^{ccm} in Tropfgläser und verarbeitete nun einen Teil der Mischung auf Platten. Als ich dann trotz weiterer Einübung sehr schwankende Keimzahlen wiederfand, habe ich mich nicht lediglich auf Nachprüfung der Vorschriften Hesses beschränkt, sondern bin einzelnen Faktoren, die etwa die Resultate beeinflussen konnten, näher nachgegangen. Hesse hat die wichtigsten Bedenken gegen diese ursprüngliche Methode (Filtration ohne Gurzusatz) in seiner zweiten Arbeit selbst ausführlich geltend gemacht: es werden durchaus nicht immer bei der Filtration durch das empfohlene Filter die Bakterien nur an der Oberfläche des Filters festgehalten, sondern sie können, je nach der Beschaffenheit des Filters, auch in die tieferen Partien eindringen und dann der rückläufigen Spülung standhalten. Man mußte deshalb jede Kerze ausprobieren und die brauchbaren ständig kontrollieren. Damit war aber auch noch keine Sicherheit für die Methodik gegeben; denn erweist sich in einem voraufgehenden Kontrollversuche eine Kerze als noch brauchbar, so kann sie bei dem nachfolgenden Versuche durch die Manipulationen des Reinigens, Rückspülens und Sterilisierens minderwertiger geworden sein.

Es ist das Verdienst des Direktors der Berkefeldgesellschaft Endler, hier auf einen gangbaren Weg verwiesen zu haben. Schon in den 90er Jahren hat die Firma die Anwendung von Hilfsfilterschichten aus gepulverter Kieselgur zum Patent angemeldet. Die Verwendung des Gurpulvers¹ dient auch heute noch zur leichteren Reinigung der Filterkerzen; nach jeder Reinigung der Filtertöpfe FT und TA wird zur Erleichterung der Arbeit und zur Schonung der Filterkörper das Einschütten einer Aufschwemmung von reiner Kieselgurerde in den Topf empfohlen, die sich auf dem Filterkörper niederschlägt und selbst filtrierend wirkt. Die gleiche Methode ist auch schon in der Arbeit Plaggés „Untersuchungen über Wasserfilter“ erwähnt; bei der Beschreibung des Filters „Chamberland à nettoyer mécanique, O. André“ wird zur Verhütung des Festklebens von Schmutzteilen ein aus feinem Kieselgurpulver bestehendes sogen. *poudre d'entretien* empfohlen, das bei Neubeschickung des Apparates in Wasser aufgeschwemmt und eingefüllt werden soll; es lagere sich beim Anlassen auf den Kerzen ab, halte den großen Schmutz zurück und sei leicht bei der nächsten Reinigung zu entfernen, da es den Kerzen nur locker anhafte.

Wie bei Hesse so sind auch bei mir nach Zusatz des Kieselgurpulvers zu der zu filtrierenden Keimsuspension die Resultate besser geworden, besonders gilt das dann für die wertvolle Modifikation Hesses, das Gurpulver vor der Bakterienfiltration schon auf dem Filter niederzuschlagen.

Ich gebe zunächst eine Übersicht über Versuche, die lediglich der Frage der quantitativen Leistungsfähigkeit der Methode galten, weitere Versuche finden sich unten; sie dienten noch anderen Fragestellungen.

I. Versuche mit Kieselgurmischung.

Die geschlämmte Kieselgur war in Reagensgläsern in abgewogenen Mengen (0.1 gr^m) bei 150° 1 Stunde lang trocken sterilisiert worden. Sie wurden zur gleichmäßigen Verteilung mit 50 ccm sterilisiertem Leitungswasser aufgeköcht und nach dem Erkalten des Wassers mit diesem zu 950 ccm sterilisiertem Leitungswasser zugesetzt. Die Mischung impfte ich dann mit 0.5 ccm des letzten Verdünnungskölbchens der Bakteriensuspension und filtrierte sofort (74 cm Hg). Wo nichts anderes bemerkt, wurde immer eine 16 bis 20 stündige, bei 37° gezüchtete *Coli-Agarkur* verwendet. Als Verdünnungsflüssigkeit diente sterilisiertes Leitungswasser (3 Kölbchen mit je 50 ccm). Wurde Kochsalzlösung mit Bouillonzusatz zum Filtrieren benutzt, so geschah auch die Verdünnung in der nämlichen Lösung. Die Aussaatzahl ist die Mittelzahl von 3 oder 4 Platten, die mit je 0.5 ccm des letzten Verdünnungskölbchens am Schluß des Versuchs angelegt wurden (Mischplatten). Die Rückstoßflüssigkeit wurde auf Drigalski-Oberflächen gegeben (4 bis 6 große Schalen), das Trocknen fand im Brutschrank bei 37° statt. Auf besonderen Drigalskiplatten wurde der „Rest“ (vgl. unten) verarbeitet. Zählung der Platten nach 2 Tagen.

¹ Siehe *Katalog der Berkefeld-Gesellschaft*. Nr. 12. S. 23 u. 24.

Tabelle I.
Aufschwemmungsmedium: Sterilisiertes Leitungswasser.

Vers.-Nr.	Aussaat (Mittelzahl)	Wiedergefunden (inkl. Rest)	Vers.-Nr.	Aussaat (Mittelzahl)	Wiedergefunden (inkl. Rest)
1.	66	26	11.	67·5	34
2.	10·3	7	12.	97·5	67
3.	297	178	13.	121	67
4.	422	182	14.	103	64
5.	625	340	15.	98	70
6.	330	149	16.	91·5	37
7.	232	147	17.	86·5	52
8.	136	74	18.	298	184
9.	87	60	19.	38	33
10.	114	101			

II. Versuche mit Vorfiltration von Kieselgur.

50^{cem} sterilisierten Leitungswassers werden mit 0·1^{gram} geschlämmtem sterilisierten Kieselgurpulver aufgeköcht und nach dem Abkühlen zusammen mit 4—500^{cem} sterilisiertem Leitungswasser auf das Filter gegeben. Nachdem sich die Haut auf dem Filterkörper gebildet hatte, erfolgte die Zugabe der zu filtrierenden Bakteriensuspension.

Tabelle II.
A. Aufschwemmungsmedium: Sterilisiertes Leitungswasser.

Vers.-Nr.	Aussaat (Mittelzahl)	Wiedergefunden (inkl. Rest)	Vers.-Nr.	Aussaat (Mittelzahl)	Wiedergefunden (inkl. Rest)
1.	38·7	25	10.	80·5	65
2.	35·2	20	11.	88	67
3.	35·2	26	12.	448	167
4.	114	105	13.	590	429
5.	78·7	74	14.	130	81
6.	75	68	15.	130·5	72
7.	101	42	16.	107	98
8.	37·5	32	17. } Typus.	70	46
9.	118·2	68	18. }	143	119

B. Aufschwemmungsmedium: 0·85proz. NaCl-Lösung + 0·5proz. Bouillon.

1.	139	114	10.	291	73
2.	88	73	11.	85·7	62
3.	140	100	12.	53·2	71
4.	71	31	13.	40	61
5.	144	122	14.	45	33
6.	139	86	15.	69	82
7.	211	134	16.	406	351
8.	99	43	17.	153	115
9.	49	45	18.	140	138

Als Mittelzahl für die wiedergefundenen Keimmengen ergeben sich bei den Versuchen Tabelle I etwa 56 Prozent, Tabelle II A. etwa 60 Prozent, Tabelle II B. etwa 74 Prozent. Ich habe mithin die von Hesse ermittelten Keimzahlen nicht erreichen können. Um die Gründe hierfür und für die Ungleichmäßigkeit festzustellen, welche trotz der entschiedenen Verbesserungen durch die beiden Modifikationen noch immer auftraten, habe ich eine Reihe besonderer Versuche angestellt und einige Abänderungen getroffen.

Die Filter selbst habe ich beibehalten, ich benutzte zu allen Versuchen die von der Firma direkt bezogenen Berkefeldkerzen $10\frac{1}{3}$. Als Glaszylinder für die Filter wählte ich zunächst auf Hesses Vorschlag solche aus Jenaer Glas mit abgerundetem Boden (lichte Weite 5.3 cm ; Höhe 16.3 cm ; Fassungsvermögen 320 cm^3). Diese abgerundeten Zylinder werden aber nicht immer technisch einwandfrei geliefert: ist die Abrundung etwas stark, so kann man keine genügend sichere Abdichtung erzielen. Es ist dann auch zu befürchten, daß der Druck auf den Rand der Gummischeibe, welche auf dem Filterkörper liegt, ausgeübt und direkt auf die Filtermasse übertragen werden kann; damit ist aber eine Beschädigung des Filterkörpers leicht möglich. Die Verbindung zwischen Filterkörper und Metallkopfstück muß gelockert werden, wenn der durch die Schraubenmutter ausgeübte Druck nicht auf das Metallstück übertragen wird — wie es bei einer ebenen oder fast ebenen Flasche geschieht —, sondern auf den Rand des Filterkörpers selbst, wie es bei gewölbter Fläche des Glaszylinders zu befürchten ist. Ich wählte daher späterhin Glaszylinder mit ebenem Boden, die — wie die Verarbeitung des „Restes“ zeigte — keine oder keine nennenswerte Verschlechterung des Absaugens bedingten. Die Zylinder hatten die lichte Weite von 6.3 , innere Höhe von 14.7 cm , Fassungsvermögen 430 cm^3 . — Die von Hesse angegebene automatische Hebevorrichtung habe ich nicht besonders praktisch finden können. Für sehr große Flüssigkeitsvolumina ist sie wohl angebracht, sie ist aber entbehrlich, wenn man größere Glaszylinder mit 800 bis 1000 cm^3 Fassungsvermögen benutzt. Mir leisteten später solche mit der lichten Weite 6.3 cm , inneren Höhe 27.7 cm , Fassungsvermögen 900 cm^3 gute Dienste. Bei der automatischen Hebevorrichtung ist die Oberfläche, an welcher Keime zurückgehalten werden, durch Anwendung der größeren Flasche, der Schlauch- und Rohrleitung nicht unwesentlich vergrößert.

Eine weitere Änderung mußte ich an der Mündung der zur Rückspülung dienenden Druckpumpe (kleines Armeefilter der Berkefeldgesellschaft) vornehmen. Der Ausflußzapfen mit seiner glatten Wandung bietet dem überzuziehenden Druckschlauch keinen Halt; trotz der Befestigung mit Draht, die sich bei dem häufigen Durchleiten von heißem und

kaltem Wasser lockert, kann bei den zum Rückspülen notwendigen kräftigen Kolbenstößen der Schlauch mit dem Filter herausgepreßt werden. Man läßt deshalb am besten an dem Ausflußzapfen (s. Fig. *a*) eine Schlaucholive anbringen. Sehr unbequem erwies sich ferner das Befestigen des mit Bakterien beladenen Filters an den Druckschlauch (bei *b*) der Druckpumpe vor dem Rückstoßen. Da man das Filter mit der Hand nicht anfassen darf und das einfache Einschrauben mit Hilfe von sterilen Pinzetten oder einer schmalen Drahtzange, die man an dem Filtergewinde ansetzt, nicht genügt, um ihm die nötige Festigkeit zu geben, so benutzte ich eine nach genauen Abmessungen gefertigte Kreiszange (*c*), mit der das Filter

an seinem Metallring (*d*) fest angefaßt werden kann; ein weiteres Einschrauben in den Druckschlauch kann nun leicht erfolgen. Nach einer Reihe von Versuchen sitzt aber das Schraubengewinde in dem aufgelockerten Druckschlauch nicht mehr genügend fest, um dem Rückstoßdruck stand zu halten. Ich habe deshalb an den Druckschlauch eine Tülle mit Schlauchrullen und Innengewinde angeschlossen (*e*); damit ist eine Befestigung des mit Bakterien beschickten Filters an die Druckpumpe ohne Schwierigkeit möglich, es wird nach beendiger Filtration und Lösung der Schrauben mittels eines langen, starken, in das Innere des Filter-

gewindes eingeführten Drahtes herausgehoben, mit steriler Pinzette am Gewinde gefaßt, in das Tüllenende eingeführt und schließlich für die letzten Schraubentouren mit der Kreiszange völlig eingebracht. Die kleine Gummiplatte, welche das Filter während des Filtrierens gegen den Glaszylinder abschloß, muß am Filter bleiben, damit bei dem nochmaligen Rückstoß nicht Wasser zwischen Tüllenende und Filterflasche ausgegossen wird. Man kann sich auch eine Druckpumpe mit passendem Innengewinde herstellen lassen, auch ist die Berkefeldgesellschaft meiner Anregung gefolgt, Filtration und Rückspülung in einem Apparat vorzunehmen.

Die Versuche zur Ermittlung von Ungleichmäßigkeiten in der Methodik, die die Resultate beeinflussen könnten, betreffen das Kieselgurpulver, den Einfluß des Trocknens und des Volumens der Rückstoßflüssigkeit, die Verarbeitung des Restes, die Aussaatbestimmung und die Art der Suspensionsflüssigkeit.

Das Kieselgurpulver. Es entsteht zunächst die Frage, ob dieser Zusatz zu der zu filtrierenden Flüssigkeit als indifferent zu bezeichnen ist.

Versuch 1. Von der Berkefeldfirma bezogenes, geschlämmtes Pulver wird 1 Stunde bei 150° sterilisiert und in der Menge von 0.1^{gram} auf je 2 Kölbchen (I, II) mit 50^{ccm} sterilisiertem Leitungswasser gegeben, Kölbchen III, IV mit dem gleichen sterilisierten Wasser bleiben ohne Gurzusatz. Die 4 Kölbchen werden mit 0.5^{ccm} einer Suspension von B. coli in Leitungswasser versehen, danach im Brutschrank bei 37° gehalten. Die Zahlen sind Mittelzahlen von 4 Agarmischplatten.

Versuch 1.

	a) Kölbchen mit Kieselgur		b) Kölbchen ohne Kieselgur	
	I	II	III	IV
Aussaat pro 1 ^{ccm}	120	120	120	120
in 1 ^{ccm} nach 1 Stde. . .	70	65	100	95
„ 1 „ „ 2 Stdn. . .	70	57	25	5
„ 1 „ „ 6 „ . .	56	155	0	0

Versuch 2.

Aussaat pro 1 ^{ccm}	355	—	355	—
in 1 ^{ccm} nach 1 Stde. . .	330	—	280	—
„ 1 „ „ 2 Stdn. . .	170	—	66	—
„ 1 „ „ 6 „ . .	100	—	0	—

Es zeigt sich, daß der verwendete Colistamm im Leitungswasser ohne Gurzusatz schneller abstirbt als im Wasser mit Zusatz. Bei längerer Versuchsdauer muß man damit rechnen, daß der Gurzusatz nicht indifferent ist. Das ist vor allem von den verschieden vorbehandelten Gursorten zu erwarten. Kieselgurpulver ist ja kein chemisch reines Produkt, die Gur besteht aus Kieselpanzern von Diatomeen und demgemäß auch aus organischer Substanz, ferner Eisen, Tonerde, Kalk, Magnesia. Nach Mitteilung der Berkefeldgesellschaft ergaben Analysen der weißen Kieselgur einen Gehalt von: organischer Substanz 2.3 bis 3 Prozent, Eisenoxydul 1.5 bis 2.9 Prozent, Tonerde 1.6 bis 2.4 Prozent, Kalk 0.8 bis 1.3 Prozent, Magnesia 0.0 bis 0.6 Prozent, Kieselsäure 80 bis 90 Prozent. Es ist zum mindesten nötig, geschlämmtes Pulver zu beziehen und das Schlämmen nötigenfalls zu wiederholen. Will man noch eine weitergehende Reinigung vornehmen, so empfiehlt die Firma: Auskochen der Gur mit doppelt verdünnter Salzsäure und Zusatz von chlorsaurem Kali, Auswaschen auf dem Filter. Es wird auch nicht gleichgültig sein, bei welchen Temperaturgraden und wie lange man das Pulver sterilisiert. Ich habe wie Hesse 1 Stunde bei 150° sterilisiert. Bei der einen Pulver-

probe genügte das nicht, es fanden sich restierende Sporen, die nach zwei Tagen auf den Nährböden auskeimten und durch Hautbildung die weitere Untersuchung der Platten unmöglich machten.

Inwieweit pathogene Keime im Wasser durch differente Bestandteile des Gurpulvers beeinflusst werden, muß erst noch geprüft werden.

Für Typhus habe ich die Versuche so vorgenommen, daß ich zunächst auf dem Filter eine Kieselgurhaut von 0.1 ^{grm} niederschlug, diese dann mit Rückstoß direkt auf Drigalskiplatten abhob und nun 0.5 ^{ccm} einer Typhussuspension zumischte. Die gleichen Quantitäten wurden auf Drigalskiplatten ohne Kieselgur gegeben.

Keimzahlen auf Drigalskioberflächen (Mittel von 4 Platten):

	ohne Kieselgur	mit Kieselgur	Prozent
Versuch 1.	216	53	24.5
„ 2.	123	119	96.8
„ 3.	123	112	91.0

Versuch 1 kann nicht mitzählen, da hier die Oberflächen zu stark trocken geworden waren, aus den übrigen Versuchen geht eine Beeinflussung der Typhusbazillen durch das angewandte Gurpulver nicht hervor.

Einfluß des Trocknens. Die starke Schädigung, welche die Typhusbazillen in der Kieselgurhaut in dem eben angeführten Versuch 1 bei stärkerem Trocknen erfahren hatten (bei *B. coli* hatte die gleiche Zeitdauer des Trocknens sich nicht ungünstig bemerkbar gemacht), war die Veranlassung, diese Frage noch näher zu prüfen und zwar zur gleichmäßigeren Gestaltung der Versuchsbedingungen im Faust-Heimschen Apparat.

Versuch 1. 8 große Drigalskischalen von gleicher Nährbodenschicht (2 ^{mm}) wurden mit je 0.5 ^{ccm} Typhussuspension beschickt, Ausbreitung mittels Glasspatel. Die Platten wurden verschieden lange im Apparat der Luftstromtemperatur von 35 bis 36° ausgesetzt und dann umgekehrt im Brutschrank aufbewahrt.

Bakterienart: Typhus.

Aussaat (Mittel)	49.
Platte 1 u. 2 = 5 Min. Trocknung	43.5.
„ 3 „ 4 = 10 „ „	40.
„ 5 „ 6 = 16 „ „	39.
„ 7 „ 8 = 20 „ „	32.

Versuch 2. Wie oben, aber auf jede Platte außerdem 0.1 ^{grm} steriles Kieselgurpulver, suspendiert in 2 ^{ccm} sterilisiertem Wasser.

Aussaat	72.
Platte 1 u. 2 = 15 Min. Trocknung	58.5.
„ 3 „ 4 = 25 „ „	31.5.

Die Versuche mit Endoplatten lieferten ähnliche Resultate. Da nun die Typhusbazillen gegenüber dem Trocknen noch nicht einmal die empfindlichsten Bakterienarten sind, so wird man bei der Untersuchung auf pathogene Wasserkeime auf den Trocknungsgrad des Kieselgurbelags, der ja selbst eine sehr stark trocknende Wirkung besitzt, ganz besonders das Augenmerk richten müssen. So sind mir zwei Versuche mit Ruhrbazillen (Typus Shiga-Kruse) dadurch vollständig mißglückt; in zwei anderen Versuchen, in denen ich eine sehr kurze Trocknungszeit wählte, fand ich 89.6 und 92.5 Prozent unter sonst gleichen Bedingungen; es konnte nur eine zu starke Trocknung der Grund für das Mißlingen der vorhergehenden Versuche gewesen sein: dabei war aber den Platten diese zu starke Trocknung ebensowenig anzusehen, wie den oben erwähnten, den starken Rückgang aufweisenden Typhusplatten. Trocknet man weniger stark, so daß der auf den Nährbodenoberflächen ausgebreitete Gußbelag noch eine bestimmte Menge Feuchtigkeit enthält, so liefert der Typhusbacillus nicht mehr die charakteristischen kleinen geschlossenen Kolonien, sondern es wachsen Hautkolonien, die 1 bis 2^{cm} und noch mehr im Durchmesser betragen. Damit ist die Isolierung der Typhusbazillen bei qualitativen Prüfungen außerordentlich erschwert. Man findet zwar auf weniger dichten Platten die Stellen, wo der Typhusbacillus zu vermuten ist, heraus: auf der trockenen Gurhaut erscheint bei auffallendem Lichte eine flache, blaue, feuchte Aufhellungszone, in deren Mitte eine wenig prominente Erhebung (Ausgangskolonie) sich befindet. Aber schon die Reinkulturkolonien gehen ineinander über; hat man eine Mischkultur vor sich, so ist das Erkennen der Typhuskolonien in der Regel auf solchen Platten unmöglich. Wendet man andererseits stärkere Trocknungsgrade an, so besteht die Gefahr der Schädigung. Man hat aber für das Zuviel oder Zuwenig des Trocknens des Kieselgurbelags keinen Maßstab. Auch wenn der Belag auf den Platten trocken erscheint, so kann sich doch soviel Feuchtigkeit in der Gurmasse finden, daß die Typhusbazillen zum Hautwachstum kommen. Es vollzieht sich auch auf ein und derselben Nährbodenoberfläche, auch wenn die Platten beim Trocknen im Brutschrank horizontal stehen und die Nährbodenschichten gleich dick sind, das Trocknen nicht gleichmäßig: man muß dann immer mit dem Spatel nachhelfen, um die Flüssigkeitsreste weiter auszubreiten. Bestimmte Stellen erfahren eine intensivere Trocknung wie andere.

Man könnte vermuten, daß es für das Resultat nicht gleichgültig ist, ob man das auf die Plattenoberfläche aufzutragende Volumen der Rückstoßflüssigkeit kleiner oder größer wählt. Bei der kleineren Menge wird man ein rascheres Trocknen erreichen, bei dem größeren Volumen bleiben die Keime auf der Nährbodenfläche eine längere Zeit mit der Aufschwem-

mungsflüssigkeit, die sich konzentriert, in Berührung. Eine besondere Frage ist dann auch, wie sich dabei die Zumischung von Kieselgur äußert. — Meine Versuche in dieser Richtung haben ergeben, daß die wiedergefundenen Colikeimzahlen die gleichen sind, wenn die aufgetragenen Volumina auf großen Drigalskiflächen 0.5, 1, 2 oder 4^{ccm} betragen; das Trocknen geschah dabei im Brutschrank bei 37° bei abgehobener Oberschale. Mischt man Kieselgur zu diesen Colisuspensionen hinzu, so tritt bei kurzem Trocknen eine Schädigung nicht ein, wenn die Suspensionsflüssigkeit Leitungswasser ist, bei Verwendung von Kochsalzlösung mit 0.5 Prozent Bouillon kam es hingegen mehrmals zu einer geringen Schädigung bei Auftragen der Flüssigkeitsvolumina 2 bis 4^{ccm}. Man hätte gerade im Gegenteil erwarten können, daß innerhalb dieser schwachen Nährlösung es zu einer Keimvermehrung auf der Nährbodenfläche hätte kommen müssen. Vielleicht erklärt sich die Schädigung aus dem Konzentrierterwerden der Salzlösung und der gleichzeitigen Wasserentziehung durch das Kieselgurpulver.

Für quantitative Bestimmungen können sich Schwankungen in dem Prozentsatz der wiedergefundenen Keime auch dadurch ergeben, daß man den im Glaszylinder verbleibenden Rest mit verarbeitet oder vernachlässigt. Auch ist an die Glasspatel zu denken, die man zum Ausstreichen der Rückstoßflüssigkeit, namentlich des ersten Stoßes, benutzt. Hesse empfiehlt in seiner ersten Arbeit, den Rest stets zu verarbeiten, später schaltete er ihn dadurch aus, daß er ihn nach Abänderung der Technik vollständig absaugte. Man könnte trotzdem erwarten, daß sich in dem den Filter umgebenden Glaszylinder während der Versuchsdauer Keime absetzen, und daß das namentlich der Fall sein müsse, wenn man dem zu filtrierenden Wasser Kieselgurpulver zusetzt, von dem sich immer Partikelchen am Boden des Zylinders abgesetzt finden. — In meinen Versuchen war die Quantität der zurückbleibenden Flüssigkeit ganz verschieden. Es richtet sich das nach der Beschaffenheit der unteren Filterfläche, die zwischen äußerer Metallfassung und der abschließenden Gummischeibe freibleibt. Man kann schließlich auch durch länger fortgesetztes Aspirieren den letzten Rest fortsaugen, damit aber wird meist die Versuchsdauer nicht unwesentlich verlängert. Ich habe bei der Bestimmung der Restkeimzahl nicht nur die zurückgebliebene Flüssigkeit direkt auf Platten gebracht, sondern auch mit sterilem Wasser die unteren Glaszylinderflächen abgespült und das Spülwasser auf Platten gegeben. In der folgenden Tabelle sind die Restkeimzahlen mit der Keimaussaat und mit der Zahl der in der Rückspülflüssigkeit wiedergefundenen Keime verglichen.

Keimart: *B. coli*.

Vers.-Nr.	Aussaat	Wieder- gefunden bei der Rückspülung	Rest	Vers.-Nr.	Aussaat	Wieder- gefunden bei der Rückspülung	Rest
1.	99	43	0	15.	87	60	0
2.	31	23	0	16.	114	101	0
3.	232	142	5	17.	135	161	1
4.	136	73	1	18.	330	148	1
5.	297	171	7	19.	118	68	0
6.	98	69	1	20.	81	65	0
7.	92	37	0	21.	88.8	62	0
8.	625	336	4	22.	165	111	2
9.	98	67	0	23.	153	136	2
10.	68	34	0	24.	135.5	58	3
11.	38	31	2	25.	69	82	0
12.	121	67	0	26.	448	167	0
13.	98	67	0	27.	355	304	3
14.	68	32	1				

Unter 13 Versuchen mit einer niedrigeren Aussaat als 100 Keime (in 1 Liter) war der Rest 11mal keimfrei und enthielt in zwei Fällen 1 Keim. In der Hälfte der Versuche enthielt der Rest überhaupt keine Keime. Im Höchstfalle würden noch nicht 5 Prozent zu der wiedergefundenen Zahl zu addieren sein, im Mittel der 27 Versuche 1.4 Prozent. Die tatsächliche Keimzahl, die im Glaszylinder zurückbleibt, ist natürlich etwas höher, da man annehmen muß, daß an den Wänden Keime hängen bleiben.

Hesse empfiehlt im Interesse des vollständigeren Absaugens die am Fußboden des Glaszylinders zur Abdichtung dienende Gummischeibe parallel zu ihrer Peripherie um etwa 3^{mm} zu verkleinern. Ich habe diese Vorschrift in allen meinen Versuchen befolgt, wurde aber gelegentlich von Hrn. Endler darauf aufmerksam gemacht, daß dies nicht rätlich sei. Ich habe daraufhin in vier Parallelversuchen mit demselben Filter die Scheibe unverkürzt und gekürzt angewendet. Die Versuchsanordnung war die gleiche wie sonst (Niederschlagen von 0.1^{grm} Kieselgur mit sterilem Wasser auf die Kerze, Durchsaugen von 1 Liter des bakterienhaltigen Wassers u. s. f.).

		Aussaat	Wieder- gefunden	Prozent im Mittel
A. Unverkürzte Scheibe.	Versuch 1.	132	121	79.9.
	" 2.	36	31	
	" 3.	216	149	
	" 4.	123	90	

		Aussaat	Wieder- gefunden	Prozent im Mittel
B. Gekürzte Scheibe.	Versuch 1.	92.5	61	} 74.2.
	" 2.	101	69	
	" 3.	122	96	
	" 4.	124	114	

In den Versuchen A. 1, 2, 4 blieb ein Rest mit je etwa 1^{cem}, der keine Keime enthielt. Es ergibt sich eine etwas höhere Zahl der wiedergefundenen Colikeime bei Anwendung der unverkürzten Scheibe. Ich möchte auch auf Grund von anderen Beobachtungen das Verkürzen der Scheibe nicht empfehlen: man kann beim Ausführen des Rückstoßes wahrnehmen, daß die an der unteren Filterfläche (zwischen Metallfassung und Gummischeibe) gebildete Kieselgurhaut sich am wenigsten gut abhebt. In zwei Versuchen habe ich diese Fläche nach Beendigung des Rückstoßes noch mit sterilem Platinspatel abgeschabt und in dem einen Falle 1 B. coli (Aussaat 67.5; wiedergefunden in der Haut 33), in dem anderen Falle 3 B. coli (Aussaat 297; wiedergefunden 178) nachweisen können. Je schmaler also die Filterzone an der Unterfläche ist, um so günstiger scheint das für das Wiederfinden der abfiltrierten Keime zu sein. Eine wesentliche Verringerung der Filterzeit durch das Abkürzen der Scheibe ist mir nicht aufgefallen.

Der Rest, der nach dem Ausbreiten der Rückspülflüssigkeit (mit Kieselgur) auf der ersten Platte (Drigalski- oder Endoagar) an dem Glaspatel verbleibt, wurde in 22 Versuchen derart ermittelt, daß der Spatel über eine oder zwei Platten gestrichen wurde.

Originalplatte } mit Kolonien	41	34	55	48	61	78	83	208	98	135	181	26	24	38	106	92	227	217	539	517	31	22
Spatelrest . .	0	0	4	2	3	0	0	3	3	0	3	0	0	0	0	0	1	4	2	0	0	0

In 13 von 22 Versuchen enthielt also der Spatel keine Restbakterien. In allen Versuchen ergibt sich 0.9 Prozent als Mittelwert, im Höchstfalle 7.3 Prozent. Dieser hohe Prozentsatz bei relativ niederer Aussaat (55) erklärt sich wohl daraus, daß es sich hier nicht um eine homogene Suspension bei der Verteilung auf Platten handelt, sondern um die Ausbreitung der Filterhaut. Man wird für die Untersuchungen in der Praxis nur einen Spatel für alle Platten nehmen und wird auch bei genauen Untersuchungen den Fehler, der durch einen etwaigen Spatelrest entsteht, vernachlässigen können.

Eine weitere Fehlerquelle, die zu einer nicht ganz richtigen Beurteilung der Methode führen könnte, ist in der Art der Suspensionsflüssigkeit gelegen, die man zu den theoretischen Vorversuchen benutzt.

Im Gegensatz zu Hesse habe ich als Filtrierflüssigkeit nicht Kochsalzlösung, sondern Leitungswasser gewählt, nur für Vergleichszwecke nahm ich Kochsalzlösung. Daß Hesse die letztere bei der rückläufigen Spülung benutzte, hatte seinen Grund darin, daß er die Spülflüssigkeit anfangs in Gelatine gab, deren Leim- und Nährstoffgehalt durch Wasserzugabe ja zu stark vermindert worden wäre. Bei Aufgabe der Rückspülflüssigkeit auf Nährbodenoberflächen kann aber die Benutzung von Kochsalzlösung zur rückläufigen Spülung nicht ohne weiteres als indifferent bezeichnet werden, hier muß durch Kontrollversuche ermittelt werden, inwieweit sich die Keimzahl während der Abdunstungszeit unter dem Einfluß des sich stärker konzentrierenden Kochsalzes verändert. Die verschiedenen Keimarten und -stämme können sich hierbei vielleicht verschieden verhalten, von vornherein kann man das nicht wissen. Hesse hat nun aber dann für die Filtration überhaupt Kochsalzlösung beibehalten, und zwar, wie es scheint, bis zum Versuch 27 seiner ersten Arbeit nur Kochsalzlösung, hingegen für die Untersuchung größerer Flüssigkeitsmengen, wie aus der Bemerkung auf Seite 541 hervorgeht, Kochsalzlösung plus 0.5 Prozent Bouillon (bei Coli und Paratyphus B). Wie auf Seite 541 vermerkt ist, trat bei Paratyphus B in physiologischer Kochsalzlösung ohne Zusatz eine Verminderung ein (nach 3 bis 4 Stunden um 3 bis 4 Prozent, nach 5 Stunden waren von 3 bis 400 Paratyphusbazillen bei Zimmertemperatur und unter Lichtabschluß nur noch 3 bis 4 vorhanden). Zugabe von 1 Prozent Bouillon ergab anderseits in 4 bis 5 Stunden eine erhebliche Vermehrung, er entschied sich daher bei diesen Versuchen für $\frac{1}{2}$ Prozent Bouillonzusatz, bei dem er Vermehrung in etwas geringerem Grade wahrnehmen konnte. Es sei hier erwähnt, daß auch in der zweiten Arbeit Hesses Seite 313 bei den Coliversuchen 1 bis 4 als Filtrierflüssigkeit nach brieflicher Mitteilung die physiologische Kochsalzlösung mit Zusatz von $\frac{1}{2}$ Prozent Bouillon verwendet wurde. Ich halte es nicht für ausgeschlossen, daß in manchen Fällen der hohe Prozentsatz der von Hesse wiedergefundenen Keime in einer Vermehrung während der Versuchsdauer eine Erklärung findet. Hesse fand schon bei der ursprünglichen Methode, die ja nach seiner späteren Kritik unzulänglich war, in einzelnen Fällen bis zu 130 Prozent Einsaat wieder! Er gibt selbst zu, daß es schon aus rein mechanischen Gründen unmöglich sei, alle eingesäten Bakterien wiederzufinden. Die hohen Zahlen ist er geneigt auf ungleichmäßige Verteilung der Bakterien zurückzuführen. Man wird aber für solche Versuche eben Keimarten und Stämme von vornherein wählen müssen, bei denen eine gleichmäßige Verteilung möglich ist. So berechtigt ferner ein gewisser Bouillonzusatz zum Wasser oder zur physiologischen Kochsalzlösung für bestimmte Bakterienarten und Stämme ist, so darf diese Forderung

doch nicht verallgemeinert werden, wenn man ein indifferentes Aufschwemmungsmedium braucht. Es bleibt nichts anderes übrig, als das für die betreffenden Arten und Stämme unter den wechselnden Bedingungen der Versuche auszuprobieren. Erfolgt im warmen Zimmer in einer schwachen Nährlösung eine Vermehrung bestimmter Keimarten, so würde damit eine recht unsichere Unterlage für die Beurteilung der Methode selbst gewonnen sein. Hesse schreibt: „In praxi werden derartige Bedenken insofern eine geringe Rolle spielen, als in einem mit lebenskräftigen, dem Darm entstammenden Typhusbazillen verunreinigten Brunnenwasser stets genügend organische Stoffe vorhanden sein werden, so daß ein schnelles Absterben nicht zu befürchten ist, eine Vermehrung aber im Interesse des Nachweises nur mit Freuden zu begrüßen wäre. Allerdings wird letztere nicht erwartet werden dürfen.“ Man muß dem letzten Satz zufügen: wohl aber wird eine Vermehrung der Saprophyten zu befürchten sein; es muß vielmehr gerade mit Hinblick auf den praktischen Nachweis pathogener Keime im Wasser zunächst ein indifferentes Medium gewählt werden.

Für den von mir verwendeten Colistamm nahm ich folgende Prüfung vor:

Eine Öse 16 bis 20 Stunden alter Agarkultur wird in 50^{cem} (I) physiologischer Kochsalzlösung + 0.5 Prozent Bouillon verteilt, davon 0.1^{cem} in 50^{cem} (II) ebensolcher und hiervon 0.5^{cem} in 50^{cem} (III) der gleichen Aufschwemmungsflüssigkeit. Von Kölbchen III erfolgten Aussaaten (0.5^{cem}) auf je drei sterile Petrischalen, Übergießen und Mischen in der Platte mit neutralem Agar. Die Kölbchen wurden bei Zimmertemperatur unter denselben Bedingungen wie die filternde, von derselben Keimsuspension infizierte Flüssigkeit gehalten. Am Ende der Filtration erneute Entnahme von 0.5^{cem} aus dem geschüttelten dritten Kölbchen.

1. Verhalten von *B. coli* in Kochsalzlösung + 0.5 Proz. Bouillon.

Keimzahl pro 1^{cem}.

Vers.-Nr.	Bei Beginn des Versuches	Am Schluß des Versuches	Nach wieviel Minuten?	Vers.-Nr.	Bei Beginn des Versuches	Am Schluß des Versuches	Nach wieviel Minuten?
1.	355	406	60'	5.	131	139	50'
2.	165	153	50'	6.	176	214	60'
3.	88.5	111.5	45'	7.	148	139	50'
4.	267	315	55'	8.	198	227	60'

In der großen Mehrzahl der Versuche vermehrte sich also dieser Colistamm während der Dauer eines Filtrationsversuchs. Ich prüfte daher das Verhalten im sterilen Leitungswasser.

2. Verhalten von *B. coli* im sterilen Leitungswasser.

Versuchsanordnung wie oben, auch die Verdünnungskölbchen I und II enthielten Leitungswasser.

Vers.-Nr.	Bei Beginn des Versuches	Am Schluß des Versuches	Nach wieviel Minuten?	Vers.-Nr.	Bei Beginn des Versuches	Am Schluß des Versuches	Nach wieviel Minuten?
1.	118	121	45'	7.	181	182	50'
2.	162	176	1 ^h 30'	8.	108	109	55'
3.	86	79	60'	9.	101	122	55'
4.	79	75	60'	10.	448	590	1 ^h 15'
5.	78	71	50'	11.	131	131	60'
6.	71	70	42'				

3. Verhalten von Typhus im sterilisierten Leitungswasser.

1.	345	324	1 ^h 20'	5.	140	132	50'
2.	140	144	45'	6.	299	233	45'
3.	144	148	45'	7.	151	143	60'
4.	47	64	50'				

Im allgemeinen eignet sich also im vorliegenden Falle für die betreffenden Kulturstämme das Leitungswasser gut als Aufschwemmungsmedium, die Keimzahl bleibt während der Dauer eines Versuchs ziemlich konstant; es würde für die Beurteilung der Methode keinen großen Unterschied machen, wenn man lediglich die am Anfang des Versuchs ausgesäte Keimmenge in Rechnung ziehen würde. Ich habe aber gleichwohl den am Ende des Versuchs ermittelten Zahlen den Vorzug gegeben. Freilich sind auch die im Aussaatkölbchen befindlichen Keime und die im Filtrierversuch benutzten nicht ohne weiteres zu identifizieren: von dem Moment ab, wo man aus der zur Aussaat dienenden Bakteriensuspension eine kleine Quantität in ein größeres Volumen Flüssigkeit bringt (um sie aus diesem größeren Volumen wieder zurückzugewinnen), können auf diese Bakterien eine ganze Reihe begünstigender oder schädigender Momente einwirken, deren schließlichen Einfluß auf die Keimzahl wir nicht erfahren, da wir der wenigen in dem großen Volumen verteilten Bakterien nicht habhaft werden. Ermitteln wir ihre Quantität durch das Verfahren mit dem Berkefeldfilter, so erhalten wir noch nicht ohne weiteres einen Einblick in die Leistungsfähigkeit dieser Methode, weil wir ja nicht wissen, wieviel der eingesäten Keime während des Versuchs zugrunde gingen oder sich vermehrt haben. Die der Filtrierung unterliegende Flüssigkeit enthält eine bei weitem geringere Keimzahl als die zum Vergleich dienende Ausgangssuspension, es ist bekannt, daß in solchen dünneren Suspensionen die Keimzahl sich anders verhält, wie in dichteren. Filtriert man eine schwache Nährlösung, so sind vielleicht während der Filtration für die Keime andere Lebensbedingungen gegeben wie in der Kontrollflüssigkeit, wir wissen nicht,

ob im Filter das stete Vorbeiführen neuen Nährmaterials verbunden mit der günstigeren Sauerstoffzufuhr belebend auf die Keime einwirkt, oder ob nicht andere begünstigende oder schädliche Einflüsse bestehen.

Hesse erwähnt S. 541, daß er Zählplatten zu Beginn und am Ende der Filtration angefertigt und das Ergebnis danach berechnet habe. Es ist leider nirgends angegeben, wie diese Berechnung erfolgt ist: sind nur die Zahlen am Ende der Filtration berücksichtigt, oder ist ein Mittelwert berechnet? Wurden auch bei allen späteren Versuchen am Schluß der Filtration von dem Ausgangsmaterial Zählplatten angelegt? Man muß annehmen, daß vom 28. Versuch ab (S. 546) das nicht der Fall gewesen ist, denn von hier ab wird bei der Versuchsanordnung nur erwähnt, daß soundso viel Kochsalzlösung (mit oder ohne Bouillon?) mit Bazillen infiziert wurde. Später (S. 316 der zweiten Arbeit) findet sich die Notiz, daß bei jedem Versuch mehrfach 1^{cem} der letzten Verdünnungsstufe zu Zählplatten benutzt wurde. Es bleibt somit im Unklaren, welche Aussaatmenge Hesse einsetzt. — Für die Aussaatbestimmung selbst habe ich in der großen Mehrzahl der Fälle nicht nur Drigalski- oder Endooberflächen benutzt, sondern auch in der gewöhnlichen Weise Platten mit neutralem Agar gegossen (wobei ich die abgemessene Bakteriensuspension direkt in die sterile Platte gab und dann den Agar unter Schwenken der Platte aufgoß). Hesse macht S. 526 Hilgermann zum Vorwurf, daß er für seine Versuche selbst Drigalskioberflächenkulturen, für die Kontrollzählplatten aber Agarmischplatten verwendet habe. Wie aus meinen vergleichenden Versuchen hervorgeht, weichen die Mittelzahlen nicht erheblich voneinander ab, wohl aber sind die Agarmischplatten in jedem Falle eine schätzbare Kontrolle für die Oberflächenaussaaten, bei denen die jeweilige Beschaffenheit des schwerer herzustellenden Nährbodens, der Trockenheitsgrad der Oberfläche, die Art der Aufbewahrung im Brutschrank usw.. beeinflussen können.

Vergleich zwischen Oberflächenaussaaten und Mischplatten.

Vers.-Nr.	Bakterienarten	Oberfläche	Keimzahlen	Mittel	Mischplatten	Keimzahlen	Mittel
1.	B. coli	Endo	140 132	136	Gewöhnlicher Agar	132 128 134	131
2.	„ „	Drigalski	43 41 46 40	42	desgl.	34 38 44 40	39
3.	„ „	„	539 565 517 561	545	„	523 465 592 597	544
4.	„ „	„	99 103 95 85	95.5	„	79 78 94 83	83.5
5.	„ „	Endo	103 115	109	„	87 98	92.5
6.	„ „	Drigalski	44 38	41	„	41 42 33	38.7
7.	„ „	„	185 231	208	„	197 211 224	211
8.	Typhus	Endo	142 124 148	138	„	141 116 138	131.7

Die Unterschiede sind also nicht sehr groß, man muß eben Platten-serien anwenden, um Mittelzahlen zu erhalten.

Da man die günstigsten Zahlen bei dem Bakteriennachweis durch das Berkefeldfilter dann erhält, wenn man die Außenfläche des Filters mit einem Mantel von Gurpulver überzieht, der die Keime vor dem tieferen Eindringen in die Kerze schützt, so war die Frage naheliegend, ob es denn nun noch wie bei der ursprünglichen Methode ohne Kieselgurpulver nötig sei, nach beendeter Filtration die Rückspülung anzuwenden oder ob man nicht einfacher verfahren könne. Wie oben ausgeführt, hat schon Klein die an der Oberfläche des Filters abgefangenen Keime mit einer weichen Bürste zu entfernen gesucht, und Chantemesse wusch die Oberfläche mit reichlichem Wasser ab. Die Resultate mußten unvollkommen sein, da sie damit nur die ganz an der Oberfläche befindlichen Keime erhielten. Da die Kieselgurschicht aber das Eindringen hindert und sich offensichtlich leicht abheben läßt, so konnte man versuchen, sie abzuschaben. Ich habe das zunächst mit einem weichkantigen Platinspatel getan, dann aber Haarpinsel vorgezogen, die ich durch Eintauchen in kochendes Wasser sterilisiert hatte. Man muß dabei vorsichtig sein, damit der Pinsel nicht auseinander fällt. Auch mit dem Platinpinsel läßt sich die Gurhaut leicht entfernen. Es empfiehlt sich, den Pinsel reichlich mit Wasser zu befeuchten und auch nach Entfernung der Gur noch mit Wasser nachzuspülen. Damit das noch energischer geschieht, kann man steriles Wasser aus einer Spritzflasche, deren Auslauföffnung am besten recht fein ist, auf das von der Kieselgurhaut befreite Filter aufspritzen und das Spülwasser direkt auf die Plattenoberflächen geben.

Bei den vergleichenden Versuchen wurden Parallelreihen mit denselben Filtern angesetzt. Die Versuchsanordnung war die übliche: Niederschlagen eines Kieselgurmantels mit 0.1 ^{grm} Gur vor dem Versuch, Durchfiltrieren der Keimsuspension (*B. coli*, 1 Liter). Das eine Mal wurde sodann wie gewöhnlich die Filterhaut durch Rückstoß abgehoben, das andre Mal durch Pinsel.

Kerze Nr.	I. R ü c k s t o ß			II. P i n s e l		
	Aussaat	Wieder- gefunden	Prozent	Aussaat	Wieder- gefunden	Prozent
I.	590	429	72.7	121	69	57.0
II.	448	167	37.3	135.5	61	45.0
IIIa.	108	73	67.6	116	90	77.5
b.	145	73	50.4	117	72	61.5
c.	158	90	57.0	139	118	84.8
d.	135	92	68.1	132	66	50.0
e.	119	85	71.4	97	36 ¹	37.1
im Mittel: 60.7				im Mittel: 58.9		

¹ Eine Platte zeigte Hautwachstum.

In den vorliegenden Versuchen war also die Zahl der wiedergefundenen Keime bei Abheben des Gurmantels mit dem Pinsel etwa die gleiche wie beim Rückstoß. Die Kerzen waren neu. Ob auch bei schlechten Kerzen mit Vertiefungen an der Oberfläche das Abheben des Gurpulvers mit dem Pinsel und Abspülen das Gleiche wie das Rückstoßen leisten, bleibt noch zu untersuchen. Sollten sich die Resultate verallgemeinern lassen, so wäre damit eine wesentliche Vereinfachung der Methode gegeben; denn gerade die Handhabung der Druckpumpe zum Abheben der Kieselgurhaut ist nicht ganz leicht, man hat auch bei einiger Übung die Menge der Rückstoßflüssigkeit nicht immer in Gewalt. Bei der Methode des Abstreifens und Abspülens hingegen kann man das auf die Platten aufzutragende Flüssigkeitsquantum jederzeit mit der Größe der Plattenoberflächen in Einklang bringen. Für die Fälle, bei denen es gar nicht darauf ankommt, alle Keime von dem Filter fortzubekommen, wird man jedenfalls dieses einfache Verfahren anwenden können.

Mit der von der Berkefeldfiltergesellschaft neuerdings zusammengestellten Apparatur, die Hesse am Schluß seiner dritten Arbeit erwähnt, habe ich nur zwei Versuche ausgeführt. Bei ihr wird die zur Untersuchung dienende Kerze direkt in das Armeefilter eingeschraubt. Nachdem ich zunächst 1 Liter kochendes Wasser und danach 3 Liter abgekühltes steriles Wasser durch den Apparat geschickt hatte, stellte ich einen blinden Versuch an: es wurde mit einer Suspension von 0.15 ^{grm} Kieselgur ein Mantel auf dem Filter niedergeschlagen, der nach Umschrauben (vgl. die Schilderung von Hesse III, S. 13) durch Rückstoß auf Platten gebracht wurde. Diese blieben steril. — Bei zwei Coliversuchen fand ich von 33 bzw. 134 Keimen 11 bzw. 50 wieder. Beide Male waren die Keime in 6 Liter sterilen Wassers aufgeschwemmt, das Niederschlagen des Gurmantels erfolgte auch hier vor der Bakterienfiltration.

Es sind dies natürlich zu wenig Versuche, sie zeigen aber, daß man auch bei dieser Apparatur im Anfang keine sehr hohen Prozentsätze findet. Bei weiterer Einübung wird man gewiß bessere Ergebnisse erzielen. Als einen technischen Mangel möchte ich es bezeichnen, daß man bei Herausnahme des Körpers aus dem Filterzylinder des Armeefilters bei dem Apparat, der mir zur Verfügung stand, sehr leicht mit dem Kieselgurmantel anstoßen kann, so daß sich Gurmasse abstreift. Um das Ansaugen von Luft zu vermeiden und um zu verhüten, daß nicht ein zu großer Verlust durch den Keimrückstand in Schlauchleitung und Filterzylinder entsteht, dürfte es sich empfehlen, eine Nachfiltration mit sterilem Wasser vorzunehmen, wenn es sich um genauere quantitative Versuche handelt. Da bei dem Apparat sicher schon leichte Erschütterungen beim Handhaben der Pumpe von Einfluß auf die Bildung und Unversehrtheit der Filterhaut sind, so

wird man, wenn ein Wasserstrahlsauger zur Verfügung steht, es vorziehen, diesen zum Durchsaugen des Wassers zu benutzen.

Versuche mit Filtration unter höherem Druck habe ich nur zur Orientierung an einem Wasserhahn der Berliner Leitung vorgenommen. Ein geeignetes keimarmes Wasser für diese Zwecke stand mir nicht zur Verfügung. Hingegen habe ich versucht, mit dieser Methode die Protozoen des Leitungswassers zu untersuchen; hierüber ist später zu berichten. Hier sei nur hervorgehoben, daß bei dieser Filtration unter höherem Druck die genaue Abmessung des Wassers auf Schwierigkeiten stößt, und daß im Anfang ein mehr oder weniger starkes Ablösen von Kieselgur beim Abnehmen des Metallzylinders vom Leitungshahn und beim Umdrehen und Herausnehmen der Kerze leicht eintritt.

Wie wir gesehen haben, vermögen die mannigfachen Einflüsse, denen ich im Vorstehenden nachgegangen bin, auf die Resultate der Filtrationsmethode in verschiedener Weise sich geltend zu machen und die Unregelmäßigkeiten zu erklären, unter denen meine Versuche litten. Wenn ich dadurch veranlaßt werde, die Methode des Bakteriennachweises durch das Berkefeldfilter nicht ganz so günstig wie Hesse zu beurteilen, so halte ich sie doch für einen Fortschritt. Ihr Gebiet bilden vor allem die sehr keimarmen Wässer; hier gibt die Methode die Möglichkeit, den größten Teil der in einem größeren Volumen befindlichen Keime auf den Kieselgurmantel zu konzentrieren in einer Zahl, die durch keine der bisherigen Methoden erreicht werden konnte. Man darf aber nicht damit rechnen, daß die Methode für diese quantitativen Zwecke immer gleichmäßige Resultate liefert. Für die qualitative Untersuchung auf pathogene Bakterien stört der Kieselgurzusatz das charakteristische Kolonienbild, es ist daher nötig, den Filterbelag auf größere Serien von Platten zu verteilen. Damit nähert man sich einer Forderung, die auch bei den Eisenfällungsmethoden für eine Besserung des Resultats erhoben werden muß. Diese werden durch die Methode der Berkefeldfiltration zur Zeit noch nicht überflüssig gemacht, denn sie sind einfach zu handhaben und liefern bei mittlerem Keimgehalt gute Ergebnisse. Woran es gelegen hat, daß Hesse mit diesen Verfahren wenig günstige Resultate hatte, läßt sich nicht feststellen, die Versuchsprotokolle sind nicht wiedergegeben. Da der Fällungsprozeß nur bei Innehaltung bestimmter Versuchsbedingungen normal verläuft, und Hesse nicht anführt, inwieweit er nach Erklärungen für den ungünstigeren Ausfall der Versuche gesucht hat, so besteht kein Grund, die guten Ergebnisse, die eine ganze Reihe anderer Autoren mit Methoden beobachteten, anzugreifen. Es bedarf keiner Erwähnung, daß man reine Eisenpräparate verwenden muß und nicht etwa Ferrisulfat mit 4 bis 5 Prozent Schwefelsäure. Auch das läßt sich nicht gegen die Eisen-

fällungsmethoden vorbringen, daß diesem unreinen Präparat gegenüber Choleravibrionen sich empfindlich erweisen: bisher hat noch niemand die Eisenfällung für den Nachweis von Choleravibrionen empfohlen, hierfür liegt gar kein Bedürfnis vor, es existieren m. W. auch noch keine Versuche hierüber. Ich schließe mich dem Bedenken Hesses an, daß „namentlich bei längerer Einwirkung“ eine Schädigung nicht ausgeschlossen ist, aber es wird auch kaum ein Untersucher die empfindlichen Vibrionen längere Zeit mit einer Eisensalzlösung in Berührung lassen, ebensowenig wie jemand die bei Wasserentziehung leicht zu schädigenden Vibrionen mit dem Gurpulver auf dem Berkefeldfilter oder der Nährbodenoberfläche längere Zeit trocknen lassen würde. — Das Ziel der Eisenfällungsmethoden war zunächst, Typhusbazillen im Wasser leichter auffindbar zu machen, da die direkte Untersuchung kleiner Volumina im Stich läßt. Ein typhusverdächtiges Wasser wird aller Voraussetzung nach auch andere Bakterien enthalten: die Ernährungsbedingungen der Typhusbazillen sind nicht derart, daß sie in einem Wasser existieren könnten, dessen Beschaffenheit der Anwesenheit aller anderen Wasserbakterien ein Ziel setzt. Solche niedrige Keimzahlen (in 1^{cem} weniger als 1 Keim), wie sie Hesse für den Nachweis durch das Berkefeldfilter in der künstlichen Suspensionsflüssigkeit anwandte, dürften in der Praxis bei einem typhusverdächtigen Wasser kaum oder äußerst selten vorkommen. Ich selbst habe für meinen Vorversuch bei der Eisenfällung mittlere und hohe Keimzahlen verwendet. Wenn man nun bei solchen Wässern die chemische Fällung oder die Berkefeldfiltration anwendet, so ist es gleichgültig, ob man mit diesen Verfahren alle Keime im Sediment oder Gurmantel abfängt oder nicht: solange wir für die zu suchenden pathogenen Keime im Wasser keine Elektivnährböden haben, brauchen wir ja für die Untersuchung gar nicht alle Keime, sonst müßten viel zu große Serien von Platten angelegt werden. Wenn allerdings in der Praxis Wässer vorkommen, die pathogene Keime und dabei eine minimale Gesamtzahl Bakterien enthalten, so ist es gar keine Frage, daß hier die Methode der Filtration die besten Chancen liefert. Auch für die Anwendung der Methode zu quantitativen Untersuchungen muß die Praxis die Indikationen aufstellen. Bisher hat man nicht sehr häufig das Bedürfnis gehabt, eine genauere Keimzahl zu ermitteln, wenn im Kubikzentimeter Wasser sich weniger als 1 Keim befand. Man kann sich ja dann immer noch dadurch helfen, daß man ein größeres Quantum Nährboden etwa in Kolle- oder größeren Glasschalen mit dem entsprechend größeren Volumen Wasser beschickt. Sind sehr große Volumina Wasser zur Untersuchung zu nehmen, so wird, wie erwähnt, bei solchen keimarmen Wässern die Methode auch für quantitative Bestimmungen am Platze sein. Ein geübter Untersucher wird die dabei bestehende Möglich-

keit der Verunreinigung durch fremde Keime oder Keimverluste herabzudrücken oder auszuschalten verstehen.

Hinsichtlich der qualitativen Untersuchung des Wassers mit dem Berkefeldfilter könnte man namentlich beim Lesen des Kapitels „Praktisch wichtige Versuche“ in der ersten Hesseschen Arbeit S. 543 den Eindruck gewinnen, als ob der Nachweis z. B. von pathogenen Keimen nunmehr sehr erleichtert sei. Die dort aufgeführten Versuche sind noch nach der ursprünglichen Methode ohne Gurzusatz angestellt. Hesse versetzte 75 bis 300^{cem} Pleißenwasser mit 925 bis 1900 Kochsalzlösung und impfte die Mischung mit wechselnden Mengen von Paratyphus B-Bazillen (56 bis 140). Er fand stets durch die Agglutination Paratyphusbazillen wieder, und zwar im ersten Falle (75^{cem} Pleißenwasser + 925 NaCl-Lösung + 56 Paraty.-Baz.) 25 d. h. 45 Prozent der Aussaat, in den anderen Fällen 4.2, 2.8, 1.4 Prozent der ausgesäten Paratyphuskeime. Das Gesamtvolumen der Bakteriensuspension betrug im ersten Falle 1 Liter, in den übrigen Versuchen 2 Liter Flüssigkeit. — Für das Auffinden der Paratyphusbazillen ist natürlich ihr Verhältnis zu den Wassersaprophyten in erster Linie maßgebend. Da sind denn die Versuche Hesses als mäßig zu bezeichnen. Aus Versuch 28 (S. 546) ersieht man, daß aus 75^{cem} Pleißenwasser auf fünf Drigalskiplatten 345 Wasserkeime wuchsen. Nimmt man an, daß dies Filter das Wiederfinden von 50 Prozent Keimen ermöglichte, so enthielt in jener Zeit das Pleißenwasser pro 1^{cem} $\frac{690}{75}$, das sind etwa neun auf Drigalskiagar auswachsende Keime, und das Verhältnis der Paratyphusbazillen zu diesen Begleitbakterien war 1:12, oder wenn ein sehr gutes Filter vorlag, das alle Bakterien wiederfinden ließ, 1:6. Würde man für die Untersuchung dieser Suspension so verfahren, wie es in den Typhusstationen bei der Untersuchung von Typhusfäzes geschieht, d. h. für eine Untersuchung sieben große Drigalskischalen verwenden, so würde es keine Mühe machen, auf diesen Platten 6^{cem} Wasser unterzubringen. Damit würden etwa 90 (oder 46) Wasserbakterien und 7 bis 8 Paratyphusbazillen auf diese große Nährbodenoberfläche verteilt worden sein; es kann nun keine Schwierigkeit sein, unter 12 (oder 6) fremden Kolonien eine solche des Paratyphus aufzufinden. Nun kann man aber auch unter den einfachsten Laboratoriumsverhältnissen bei Zuhilfenahme des Brutschranks zum Trocknen auf diese großen Flächen weit mehr Wasser aufgeben, oder man kann zentrifugieren, dann dürfte man auch die günstigsten Resultate, die Hesse anführt (Versuch 31, S. 546: 300^{cem} Pleißenwasser + 1700^{cem} Kochsalzlösung, geimpft mit 140 Paratyphusbazillen, das ist 1 Paratyphusbacillus auf 19 [oder 9] Begleitbakterien), noch erreichen; es finden sich in 20^{cem} der Ausgangsmischung

immer noch mehr als 1 Paratyphusbacillus. Jedenfalls ist es kaum zugänglich, für qualitative Untersuchungen auf Grund dieser Versuche die Filtrationsmethode als besonders leistungsfähig gegenüber den bisherigen Verfahren anzusprechen, und es ist unverständlich, wie Hesse nach der praktischen Untersuchung eines Brunnenwassers, in welchem er nach Aufbringen des Rückstoßes auf Drigalski- und Malachitgrünplatten weder Typhus- noch Paratyphusbazillen fand, es niederschreiben kann: „so wage ich mit aller Entschiedenheit zu behaupten, daß das Brunnenwasser zur Zeit der Untersuchung in 1500^{ccm} keine der fraglichen Krankheitserreger enthielt“. Er stützt sich dabei auf die eben kritisierten Versuche und auf den negativen Ausfall der „zuverlässigen Malachitgrünmethode“. Zudem wurde diese Untersuchung mit der ursprünglichen Methode ausgeführt, deren Unsicherheit Hesse in den späteren Mitteilungen selbst hervorhebt.

Trotzdem zweifle ich nicht daran, daß in bestimmten Fällen auch für qualitative Prüfungen die Filtrationsmethode Erleichterung bringen kann, so, wie ich wiederhole, wenn es sich in der Praxis notwendig erweist, in einem sehr keimarmen Wasser aus einem großen Volumen die Keime niederzuschlagen. Ein Erfolg für den Nachweis pathogener Bakterien ist damit natürlich noch nicht gesichert, nach wie vor muß das erstrebenswerte Ziel sein, die Saprophyten auszuschalten oder zurückzudrängen und die zu suchenden Keime in die günstigsten Bedingungen zu bringen. — Für die qualitative Leistung der Methode scheint mir der Zusatz von Kieselgur oder das Niederschlagen eines Gurmantels auf dem Filter kein so erheblicher Vorteil zu sein wie für die quantitative Untersuchung, da in der Kieselgurhaut pathogene Arten auf der Nährbodenfläche untypisch wachsen können, und da auch Saprophyten bei einem gewissen Trockengrade des Gurbelages zur Hautbildung neigen. Man wird daher größere Plattenserien zu beschicken haben oder aber mit dem Kieselgurzusatz unter 0.1^{grm} heruntergehen und besonders fein geschlämmtes Pulver verwenden müssen, wenn es sich überhaupt nicht lieber empfiehlt, für solche keimarme Wasser bei der qualitativen Prüfung die ursprüngliche Methode von Hesse ohne Gurzusatz zu verwenden. Man wird dann der Sicherheit halber zwei gut arbeitende Filter benutzen, durch die man ein größeres Quantum des verdächtigen Wassers hindurchsaugt; die Rückstoßflüssigkeit verteilt man dann auf die geeigneten Nährböden. Würde man eine Anreicherung der Rückspülflüssigkeit in einem flüssigen Medium versuchen wollen, so würde zweckmäßiger die Filtration des Wassers durch die Kieselgurhaut stattfinden, da die Beimengung eines chemisch genügend vorbehandelten Gulpulvers zu der Anreicherungsflüssigkeit kaum stören würde.

Inwieweit man den Faust-Heimschen Apparat zur Vervollkommnung der vorliegenden Methode oder überhaupt zur Wasseruntersuchung benutzen kann, wird Gegenstand einer besonderen Mitteilung sein. In seiner jetzigen Form kann er gewiß gelegentlich zur Einengung gute Dienste leisten, eine Sicherheit der Methodik ermöglicht er zurzeit nicht: dampft man Wasser auf der Nährbodenfläche ein, so vermehren sich die fremden Bakterien während der Dauer der Einengung stärker als z. B. zugesetzte Typhusbazillen; engt man auf Glasschalen ein, so ist am Schluß ebenfalls der Typhusbacillus in ungünstigerem Verhältnis anzutreffen. Sehr störend ist, daß die Temperatur im Apparat nicht konstant bleibt: gerade bei Ausschaltung von Wasserbakterien und für die Erhaltung oder Vermehrung von pathogenen Bakterien werden voraussichtlich ganz bestimmte Temperaturen, die vorerst auszuprobieren sind, von Wichtigkeit sein. Ein weiterer Übelstand, der noch abzustellen ist, liegt in der ungleichmäßigen Trocknung im Apparat: läßt man die Eindampfschalen oder Nährbodenplatten ruhig stehen, so kommt es an manchen Stellen zur stärksten Trocknung, was sicher nicht gleichgültig für das Leben der zu suchenden Keime sein kann. Man muß die Platten fortwährend drehen — vielleicht läßt sich das durch ein Uhrwerk oder eine sonstige Vorrichtung erleichtern. Man kann auch daran denken, dem einzuengenden Wasser Zusätze zu geben, die z. B. etwaigen Typhusbazillen günstigere Bedingungen gewähren (Galle od. dgl.), oder man kann Nährstoffzusätze versuchen, die als Schutz bei der Trocknung wirken, so daß man einmal stärker trocknen und auf die getrocknete Nährbodenoberfläche neue Flüssigkeit aufgeben darf.

Literatur-Verzeichnis.

1. Klein, E., 23. *Ann. Report of the Local Government Board*. 1893—1894. Suppl. S. 47. — Baumgartens *Jahresbericht*. 1895. Bd. XI. S. 284.
 2. Chantemesse, M., *Gaz. hebdomadaire de médecine et de chirurgie*. 1901. Nr. 46. S. 543.
 3. Jackson, *Hyg. Rundschau*. Bd. X. S. 212.
 4. Nebel, A., *Archiv für Hygiene*. 1903. Bd. XI.VII. Hft. 1. S. 57.
 5. Müller, *Diese Zeitschrift*. Bd. LI. S. 1.
 6. Nieter, *Hyg. Rundschau*. Bd. XVI. S. 57.
 7. v. Wunschheim, *Desinfektion*. 1909.
 8. Schmidt, P., *Diese Zeitschrift*. Bd. LXV. 423.
 9. Hesse, E., I. *Ebenda*. Bd. LXIX. S. 522. — II. *Ebenda*. Bd. LXX. S. 311. — III. *Deutsche militärärztliche Zeitschrift*. 1912. Hft. 7.
 10. Plagge, *Veröffentlichungen aus der Geb. des Militär-Sanitätswesens*. Bd. IX. 1895. S. 54.
-