

[Aus dem hygienischen Institut der Universität Leipzig.]

Ueber Lebensdauer und Absterben von pathogenen Keimen.

Von

Dr. med. **Martin Ficker**,
Assistenten am Institut.

Im Getriebe der Natur nehmen die Mikroorganismen der winzigen Dimensionen ihres Zelleibes wegen eine gesonderte Stellung ein. Gerade durch diese Kleinheit, die den Grundcharakter ihres Wesens bildet, ist es ihnen ermöglicht, mit geringsten Stoffmengen ihren Körper aufzubauen. Die Raschheit, mit der sich die Theilung und Vermehrung vollzieht, gestattet, dass sie in kürzester Zeit sich den Aussenzuständen, die einem fortwährenden Wechsel unterliegen, anzupassen vermögen, und sie müssen das, wenn die Art erhalten bleiben soll. Wir sehen in der Natur, dass die wechselnden Zustände des Klimas, der Temperatur und der Feuchtigkeit fortwährend auf die Bakterien einwirken, und wir können leicht constatiren, wie diese Aussenmomente eine lebenerhaltende oder verheerende Wirkung äussern. Die Natur bewältigt die Keime nicht durch gewaltsame Eingriffe und Desinfectionsmittel, wie sie sich in den Händen des sachkundigen Mediciners als vernichtende Waffen bewährt haben, und gleichwohl vermag sie durch die Gunst oder Ungunst ihres Wirkens mehr zu erreichen, als Menschenhand oder Menschenabsicht vermag. Als solche Momente, durch welche das Leben dieser einfachen Zellgebilde beeinträchtigt wird, sind die Wirkungen des Trocknens, der Temperatursteigerung, der Mangel an Nährmaterial, die Anhäufung von Giftstoffen und Ausscheidungsproducten hervorzuheben. Eine grosse Reihe von Einzelbeobachtungen über Einwirkungen dieser Art sind in der Litteratur nieder-

gelegt. Eine Durchsicht der zahlreichen Arbeiten zeigt, dass ganz verschiedenartige Ergebnisse diesen Untersuchungen entsprangen. Wenn wir beispielsweise sehen, dass ein Keim, wie der *Cholera bacillus*, dem Eintrocknen einmal in der kurzen Frist von wenigen Stunden erliegt, während bei anderen Versuchen die Lebensdauer unter anscheinend gleichen Umständen Monate lang beträgt, so kann dies durch das biologische Verhalten des Keimes selbst nicht erklärt werden. Es erschien mir deshalb von Bedeutung, durch systematische Versuchsanordnungen, wobei alle Nebenumstände bis ins kleinste Maass hinein Berücksichtigung fanden, festzustellen, ob sich ein gesetzmässiges Verhalten dieser Einwirkungen ermitteln lässt, d. h. ob wir die Versuchsanordnungen von vornherein derart treffen können, dass ein bestimmtes Resultat mit Sicherheit sich ergibt. Hierzu ist es nothwendig, in erster Linie die einfachsten Versuchsbedingungen zu schaffen. Aus dem Grunde wählte ich zu den nachfolgenden Untersuchungen Organismen, welche auf den üblichen Nährböden eine Dauerform nicht bilden, nämlich die Erreger der Cholera, des Typhus, der Diphtherie und der Pest. Mein Wunsch war, die Gesetze des Zugrundegehens und der Lebenserhaltung zu verfolgen, wenn die genannten Keime den unter natürlichen Verhältnissen so häufig eintretenden Zuständen eines langsamen oder rascheren Trockenwerdens ausgesetzt sind, wie sich die Keime verhalten, wenn ihnen Nährmaterial entzogen wird oder wenn ihnen Nährstoffe und Ausscheidungsproducte durch eine rasche und reichliche Wasserzufuhr weggenommen werden, und endlich erschien es als besonderer Erwägung werth, ob der kleine Bakterienzellkörper schon bei minimalsten Reizen Ausschläge zu geben vermag.

Hrn. Geh. Medicinalrath Prof. Dr. F. Hofmann spreche ich für die vielseitige Anregung und mannigfache Raththeilung im Verlaufe der vorliegenden Arbeit meinen herzlichsten Dank aus.

A. Austrocknen von Keimen.

Ein wichtiges Mittel, dessen sich die Natur in weitgehendstem Maasse bedient, um dem Leben der Bakterien ein Ziel zu setzen, ist das Austrocknen. Wie für jede Zelle, so gilt eben auch für die Bakterienzelle der Satz, dass ihr nur dann eine Lebensthätigkeit ermöglicht ist, wenn sie in ausreichendem Maasse über Wasser verfügt, um einerseits die Nährstoffe leicht aufzunehmen und andererseits die erzeugten Stoffwechselproducte rasch nach aussen abgeben zu können. Nur einzelne Mikroorganismen sind befähigt, einer Wasserentziehung mit einem Uebergang in eine Dauerform zu beantworten: vielen anderen ist dies unmöglich, für sie ist der

Tod unausbleiblich, wenn der Wasserverlust eine gewisse Grenze erreicht. Dass diesem Verwelken, wenn man so sagen darf, die meisten, nicht sporenbildenden Keime verfallen, hat man frühzeitig erkannt. Und diese Erkenntniss und das Weiterverfolgen dieser Thatsache war ja von allergrösster Bedeutung für die Erforschung der Verbreitung der Infektionskrankheiten. Die Beantwortung der Frage, ob ein pathogener Keim dem Austrocknen mehr oder weniger Widerstand entgegengesetzt und in diesem Falle, ob er durch die Luft übertragbar ist, bildet einen Haupttheil der Streitfragen.

Es erscheint gerechtfertigt, aus der vorhandenen reichen Litteratur über die Wirkung des Trocknens dem Leser eine Uebersicht der wichtigsten und zuverlässigsten Resultate zu geben. Bei einer solchen Uebersicht musste berücksichtigt werden das Alter der Cultur, da man vielfach anzunehmen geneigt war, es würden ältere Culturen eine grössere Widerstandsfähigkeit gegenüber Austrocknen besitzen als junge. Nicht minder war zu beachten, auf welchem Nährboden die Keime gezüchtet wurden und ebenso, bei welcher Temperatur das Wachsthum erfolgte. Von grösstem Einflusse musste endlich der Umstand sein, auf welchem Objecte die Trocknung sich vollzog.

Die Versuche scheiden sich in solche, bei welchen das Austrocknen in gewöhnlicher Luft, sowie in solche, bei denen es im Exsiccator stattfand. Nachfolgende Tabelle giebt zunächst die Lebensdauer bei Trocknen der Cultur auf der Fläche von Deckgläschen, Glasplatten oder Glasscherben wieder.

Tabelle I.

A. Cholera.

I. Eintrocknungsversuche auf Glas.

a) Bei gewöhnlicher Luft.

Autor	Alter der Cultur in Tagen	Temp. der Züchtung Grad C.	Cultur- boden	Haltbarkeit				Art des Glases
				in Stunden		in Tagen		
				Min.	Max.	Min.	Max.	
Kitasato ¹	1	—	Bouillon	—	3	—	—	Deckglas
Koch ²	—	—	„	3	4	—	—	„
Berecholtz ³	4	37	„	—	>24	—	—	„

¹ Kitasato, Die Widerstandsfähigkeit der Cholera Bakterien gegen das Eintrocknen und gegen Hitze. *Diese Zeitschrift*. 1889. Bd. V. S. 134ff. — Nachtrag zu der eben citirten Arbeit. *Ebenda*. Bd. VI. S. 11.

² R. Koch, Bericht über die Thätigkeit der zur Erforschung der Cholera entsandten Commission. *Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt*. 1887. Bd. III. S. 166ff.

³ Berckholtz, Untersuchungen über den Einfluss des Eintrocknens auf die Lebensfähigkeit der Cholera bacillen. *Ebenda*. 1889. Bd. V. S. 1ff.

Tabelle I. (Fortsetzung.)

Autor	Alter der Cultur in Tagen	Temp. der Züchtung Grad C.	Cultur- boden	Haltbarkeit				Art des Glases
				in Stunden		in Tagen		
				Min.	Max.	Min.	Max.	
Guyon ¹	„jung“	—	Bouillon	—	—	—	3	Glasplatte
Berckholtz	4	37	„	—	>24	—	6	Glasscherben
„	4	37	„	—	>24	—	7	Erlenmeyer
„	—	Zimmer	Gelatine	1/2	24	—	—	Deckglas
Kitasato	4 bis 102	—	„	30	40	—	—	„
Berckholtz	4	37	„	—	—	—	6	Erlenmeyer
„	—	Zimmer	„	2	—	—	7	Glasscherben
„	4	37	„	>24	—	—	8	„
Kitasato	9	Zimmer	Agar	—	30	—	—	Deckglas
„	1	37	„	—	—	—	2	„
Berckholtz	4	37	„	>24	—	—	2	„
„	4	37	„	>24	—	—	4	Erlenmeyer
„	4	37	„	—	—	2	5	Glasscherben
„	4	37	Serum	—	>24	—	—	„
„	4	37	„	—	—	—	2	Erlenmeyer
Kitasato	3	37	„	—	—	—	2	Deckglas
„	10	Zimmer	„	—	—	—	2	„
Berckholtz	4	37	Milch	—	>24	—	—	Glasscherben
b) Im Exsiccator.								
Kitasato	1	—	Bouillon	3	—	—	—	Deckglas
Berckholtz	4	37	„	—	—	1	9	Glasscherben
Finkler- Prior ²	„alte“	—	„	—	—	—	105	Glasplatte
Berckholtz	4	37	Gelatine	—	—	12	16	Glasscherben
Kitasato	9	Zimmer	Agar	30	—	—	—	Deckglas
„	1	37	„	—	—	—	2	„
Berckholtz	4	37	„	—	—	—	15	Glasscherben
Kitasato	10	Zimmer	Serum	—	—	—	3	Deckgläschen
„	3	37	„	—	—	—	4	„
Berckholtz	4	37	Milch	—	—	—	1	Glasscherben
Guyon	„junge“	—	Bouillon	—	—	—	120	Glasplatten

In der folgenden Tabelle werden diejenigen Versuche berücksichtigt, bei denen die Haltbarkeit von Cholera bacillen an Seidenfäden geprüft wurde.

¹ Guyon. *Archiv. de méd. expér. et d'anat. pathol.* 1892. Nr. 1.

² Finkler u. Prior, Forschungen über Cholera bakterien. *Ergänzungshefte Centralblatt für allgemeine Gesundheitspflege.* 1885. Bd. I. S. 398.

Tabelle II.

 II. Eintrocknungsversuche auf Seidenfäden.
 Trocknung in gewöhnlicher Luft. Im Exsiccator.

Autor	Alter der Cultur in Tagen	Temp. der Züchtung Grad C.	Cultur- boden	Haltbarkeit		Haltbarkeit in Tagen	
				in Stunden	in Tagen Min. Max.	Minim. Max.	
Sirena u. Alessi	—	—	Bouillon	1 bis 5	— —	2½	5
Kitasato	1.	—	„	24	— —	1½	—
Berckholtz	1	25	„	24	— —	—	1
„	6	37	„	24	— —	—	1
„	5	37	„	—	— 3	—	16
„	2	37	„	—	— 3	—	18
„	1	37	„	—	1 7	1	33
„	3	37	„	—	1 30	3	104
„	4	37	„	—	1 30	> 1	186
„	—	18—22	Gelatine	—	— 1	—	—
Kitasato	4 bis 102	—	„	—	2 4	3	5
Berckholtz	1	37	„	—	— > 5	—	13
„	2	37	„	—	— > 5	—	19
„	3	37	„	—	1 11	1	41
„	5	37	„	—	— 12	—	23
„	4	37	„	—	> 5 15	20	50
Sirena u. Alessi	—	—	Agar	1 bis 5	— —	2½	5
Berckholtz	1	25	„	—	— 1	—	1
„	3	Zimmer	„	—	— 1	—	1
Kitasato	1	37	„	—	— 3	—	3
Berckholtz	1	Zimmer	„	—	— 4	—	4
Kitasato	9	„	„	—	— 4	—	14
Berckholtz	5	37	„	—	1 5	5	9
„	3	37	„	—	1 5	10	17
„	4	37	„	—	1 10	5	16
„	2	37	„	—	— 11	—	> 5
„	5	Zimmer	„	—	— 15	—	5
„	1	37	„	—	> 1 21	7	167
„	4	37	Serum	—	— 3	—	—
Kitasato	3	37	„	—	— 4	—	20
„	10	37	„	—	— 3	—	16
Berckholtz	3	37	Kartoffel	—	12 23	1	12
Gamaleia	—	—	—	—	4 8	—	—

Die folgenden Tabellen geben die Versuchsergebnisse der Antrocknung von Cholerakeimen auf Gewebsarten und an Staubsorten wieder.

Tabelle III.
III. Eintrocknung auf Geweben.

Autor	Alter der Cultur in Tagen	Temp. der Züchtung	Culturboden	Bei gewöhnlicher Luft.		Im Exsiccator.		Art der Gewebe und der Erde
				Haltbarkeit in Std.	Haltbarkeit in Tagen	Haltbarkeit in Std.	Haltbarkeit in Tagen	
Koch	1 Tag bis Wochen	—	verschieden	3—5	—	—	—	Leinwand
„	4	37	Kartoffel	—	1	—	—	
„	4	25	„	—	> 1	—	—	
„	—	—	Darminhalt	—	1	—	—	
Gamaleia	—	—	„	40	—	17	—	Leinwand
Hesse	—	—	Bouillon	22	—	—	—	Shirting
Berckholtz	—	—	„	—	3—5	—	3—39	Leinwand
Germano	—	—	Agar od. Bouillon	—	1	—	—	Seidenstückchen
„	—	—	„	—	3	—	—	Leinwand, Wolle

IV. Eintrocknen auf Erde u. s. w.

Koch	1 T. bis W.	—	verschieden	3—5	—	—	—	Erde
Berckholtz	—	—	—	—	2	—	—	Gartenerde
Williams	—	—	—	3	—	—	—	Staub
Uffelmann	—	—	—	—	2	—	—	Gartenerde
„	—	—	—	20	—	—	—	weisser Sand
„	—	—	—	24	—	—	—	Strassenkehricht
Dempster	—	—	—	—	3	—	—	Sand, Gartenerde
Germano	—	—	Agar od. Bouillon	—	1	—	> 1	Feinsand, Löss, Ziegelmehl
„	—	—	„	—	3	—	1	Tuff
„	—	—	„	—	3—4	—	1	Humus
„	—	—	Fäces	—	3	—	—	Zimmerstaub
„	—	—	„	—	2	—	—	Feinsand

¹ Sirena e Alessi, Influenza del disseccamento su taluni microrganismi patogeni. *La riforma med.* 1892. p. 156 u. 173.

² Gamaleia, Ueber das Leben der Cholerabacillen im Wasser unter dem Einflusse des Eintrocknens und der Feuchtigkeit. *D. med. Wochenschrift.* 1893. S. 1250.

³ Hesse, Ueber Aetiologie der Cholera. *Diese Zeitschrift.* 1893. Bd. XIV. S. 30.

⁴ Germano, Die Uebertragung der Infectiouskrankheiten durch die Luft. IV. Mittheilung. *Ebenda.* 1897. Bd. XXVI. S. 276 ff.

⁵ William, Versuche über die Verbreitung der Cholerabacillen durch Luftströme. *Ebenda.* Bd. XV. S. 166 ff.

⁶ Uffelmann, Können lebende Cholerabacillen mit dem Boden- und Kehrichtstaub verschleppt werden? *Berliner klin. Wochenschrift.* 1893. S. 617 ff.

⁷ Dempster, The influence of different kinds of soil on the Comma and Typhoid Organisms. *Brit. med. Journal.* 1894. p. 1128.

Ausser den mitgetheilten Versuchen haben noch andere Angaben hier Berücksichtigung zu finden, die speciell die Frage der Sporenbildung der Cholera bacillen betreffen und gleichzeitig die Wirkung des Trocknens betreffen. Die Ferran'schen¹ Mittheilungen von endogener Sporenbildung und der Auskeimung der frei gewordenen Sporen zu neuen Spirillen wurden bekanntlich von Koch,² van Ermengem,³ Rapschewski³ u. A. widerlegt. Die Frage kam aber neu in Fluss, als Hueppe⁴ in dem Auftreten der bekannten kugeligen Gebilde einen echten Fructificationsvorgang erblicken wollte. Diese „Arthrosporen“ sollten angeblich gegen das Eintrocknen resistenter als die vegetativen Choleraformen sein. Dieselbe Ansicht stützt u. A. Zäublein,⁵ der die gewöhnlichen Kommaformen 2 bis 5 Minuten, die Arthrosporen jedoch 3 Stunden und 20 Minuten der Austrocknung widerstehen sah. In der Folge bewiesen de Simone,⁶ sowie Nicati und Rietsch,⁶ dass die Hueppe'schen Arthrosporen der Eintrocknung keinen grösseren Widerstand entgegengesetzten. Auch Gruber⁷ betont, dass die in alten Culturen sich findenden Kügelchen unter keinen Umständen das Austrocknen ertragen. A. Neisser⁸ endlich fand eher die Cholera culturen um so weniger resistent, je älter sie waren, je mehr Körner sie also enthielten.

In Tabelle IV sind die hauptsächlichsten bisherigen Versuchsergebnisse des Eintrocknens von Typhusbacillen zusammengestellt.

¹ Ferran nach Baumgarten. *Jahresbericht über die Fortschritte in der Lehre von den pathogenen Mikroorganismen*. 1885. Bd. I. S. 110.

² Koch, Conferenz zur Erörterung der Cholerafrage. *Berliner klin. Wochenschrift*. 1884. S. 477. — 1885. Nr. 37a.

³ van Ermengem, Rapschewski, nach Baumgarten, *Jahresber.* 1885. Bd. I. S. 110 u. 111.

⁴ Hueppe, Ueber die Dauerformen der sogen. Kommabacillen. *Fortschritte der Medicin*. 1885. S. 619.

⁵ Zäublein. *Tageblatt der 59. Versammlung deutscher Naturforscher u. Aerzte zu Berlin*. 1886. S. 206.

⁶ De Simone, Nicati und Rietsch, nach Baumgarten. *Jahresber.* 1886. Bd. II. S. 293 bezw. 295.

⁷ Gruber, Bakteriologische Untersuchung von cholera verdächtigen Fällen unter erschwerenden Umständen. *Wiener med. Wochenschrift*. 1887. S. 224.

⁸ Neisser, Versuche über die Sporenbildung bei Xerosebacillen, Streptokokken und Cholera spirillen. *Diese Zeitschrift*. 1888. Bd. IV. S. 165.

B. Typhus.

Tabelle IV.

Autor	Culturboden	Haltbarkeit in Tagen	Object der Fixation	Ort der Aufbewahrung
Gaffky ¹	Serum	90	Deckgläschen	im Zimmer
Seitz ²		28	Seidenfäden	"
Sirena und Alessi ³	Agar	41	"	über Schwefelsäure
"	"	1	"	über Chlorcalcium
"	"	18	"	im Brutschrank 37°
"	"	64	"	an „schattiger Stelle“
Billings und Peckham ⁴		229	"	im Dunkeln
"		213		im Exsiccator
Uffelman ⁵	Bouill. + Fäces	21	Gartenerde	im Zimmer
		82	weisser Sand	"
		32	Haus- u. Strassenkehr.	"
		60—80	Leinwand, Buckskin	"
Dempster ⁶		9	weisser Sand	"
"		14	schwarze Erde	"
		18	gelber Sand	"
Kruse und Pfaffenholz ⁷		5—15		
Germano ⁸	Bouill. od. Agar	1	Feinsand, Tuffboden	"
	"	3	Ziegelstaub	"
	"	5	Humus	"
	"	3	Löss	"
	Fäces	25	Zimmerstaub, Fein- sand, Humus	"
		50	Leinwand	"
		90	Wolle	"

¹ Gaffky, Zur Aetiologie des Abdominaltyphus. *Mittheilungen aus dem Kais. Gesundheitsamt.* 1884. Bd. II. S. 390.

² Seitz, Bakteriologische Studien zur Typhus-Aetiologie. Baumgarten's *Jahresbericht.* 1886. Bd. II. S. 165.

³ Sirena e Alessi. *Riforma med.* 1892. p. 173.

⁴ Billings and Peckham, The influence of certain agents in destroying the vitality of the typh. and of the colonbac. *Science.* 1895. p. 169.

⁵ Uffelman, Versuche über die Widerstandsfähigkeit der Typhusbac. gegen Trocknung und über die Möglichkeit ihrer Verschleppung durch die Luft. *Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde.* 1894. Bd. XV. S. 133.

⁶ Dempster. *Brit. med. Journal.* 1894. p. 1128.

⁷ Kruse u. Pfaffenholz, nach Flügge's *Mikroorganismen.* 1896. 2. Aufl. S. 385.

⁸ Germano, Die Uebertragung von Infectiouskrankheiten durch die Luft. I. Mittheilung. *Diese Zeitschrift.* 1897. Bd. XXIV. S. 403.

Auch bei Typhus wurde gelegentlich der Bearbeitung der Sporenfrage die Resistenz gegenüber dem Eintrocknen in Erwägung gezogen. So liess Buchner¹ kleine Mengen „körnerloser“ oder „körnerhaltiger“ Typhusbacillen auf Deckgläschen antrocknen und gab diese in den Trockenschrank bei 50 und 60° C.; die vergleichenden Versuche zeigten, dass die körnerfreien Bacillen 20 Minuten lang Trocknung bei 60° und $\frac{3}{4}$ Stunde bei 50° aushielten, hingegen waren solche mit wohlausgebildeten Körnern schon durch das blosse Antrocknen bei Zimmertemperatur, mit voller Sicherheit aber durch einen nur 5 Minuten langen Aufenthalt bei 60° getötet. Pfuhl² handhabte dieselbe Methode, nur liess er die Deckgläschen bei Zimmertemperatur unter Glasglocke liegen. Er constatirte, dass die „sporen“haltigen Zellen nach 5 Wochen sich nicht mehr entwickelten, die „sporen“freien Stäbchen jedoch erwiesen sich mit einigen Ausnahmen noch nach 8 bis 10 Wochen als gut vermehrungsfähig, ja selbst nach 14 Wochen keimten noch reichlich Typhuscolonieen aus.

In der nächsten Tabelle sind die mit Diphtheriebacillen angestellten Versuche zusammengefasst.

C. Diphtherie.

Tabelle V.

Autor	Culturboden	Haltbarkeit in Tagen	Object der Fixation	Aufbewahrt
Löffler ³	—	28	Seidenfäden	bei gewöhnlicher Luft
„	—	35—98	„	im Exsiccator
„	Membran	63—112	—	
„	Serum	121	„	„ „ bei Tageslicht
„	„	189	„	„ „ im Dunkeln
Klein ⁴	Membran	120	—	bei gewöhnlicher Luft
d'Espine et de Marignac ⁵		90—105	„	„
Park ⁶	Membran	120	—	„

¹ Buchner, Ueber die vermeintlichen Sporen der Typhusbacillen. *Centralblatt für Bakteriologie*. Bd. IV. S. 353.

² Pfuhl, Zur Sporenbildung der Typhusbacillen. *Ebenda*. Bd. IV. S. 769.

³ Löffler, Welche Massregeln erscheinen gegen die Verbreitung der Diphtherie geboten? *Berliner klin. Wochenschrift*. 1890. S. 885.

⁴ Klein, citirt bei Abel.

⁵ D'Espine et de Marignac, dto.

⁶ Park, dto.

Tabelle V. (Fortsetzung.)

Autor	Cultur- boden	Haltbarkeit in Tagen	Object der Fixation	Aufbewahrt
Roux et Yersin ¹	Membran	150	—	in Leinwand eingewickelt
Abel ²	—	61	Seidenfäden	im Freien, im Winter
„	—	74	„	bei gewöhnl. Zimmerluft
Escherich ³	Membran	30	—	„
Pernice ⁴	„	53	—	„
Reyes ⁵	—	1 1/4	—	über Schwefelsäure
„	—	12	Leinwand	bei gewöhnlicher Luft
„	—	5	Seide	„
„	—	4	Papier	„
„	—	14	Sand	„
„	—	100	Mörtel	„
Golowkow ⁶	—	20	Leinwand u. Tuch	an belichteter Stelle
„	—	1	Satin ungewaschen	„
„	—	20	„ gewaschen	„
Germano ⁷	Bouillon	40	Feinsand	—
„	„	35	Humus	—
„	„	30	Tuffboden	—
„	„	50	Löss	—
„	„	16	Ziegelmehl	—
„	„	50	Feinsand	über Schwefelsäure
„	„	40	Humus, Tuff	„
„	„	60	Löss	„
„	„	20	Ziegelmehl	„

¹ Roux et Yersin, Contribution à l'étude de la diphthérie. *Annales de l'Institut Pasteur*. 1890. p. 385.

² Abel, Beitrag zur Frage von der Lebensdauer der Diphtheriebacillen. *Centralblatt für Bakteriologie*. 1893. Bd. XIV. S. 756. — Versuche über das Verhalten der Diphtheriebacillen gegen Einwirkung der Winterkälte. *Ebenda*. 1895. Bd. XVII. S. 545.

³ Escherich, *Aetiologie und Pathogenese der epidemischen Diphtherie*. I. Wien 1894. S. 256.

⁴ Pernice e Scagliosi, nach Baumgarten's *Jahresbericht*. 1895. Bd. XI. S. 202.

⁵ Reyes, Sulla vitalità del bacillo della difterite. *Annali d'igiene sperimentale*. Nuova ser. 1895. Vol. V. p. 501.

⁶ Golowkow, nach Baumgarten's *Jahresbericht*. 1895. Bd. XI. S. 204.

⁷ Germano, Die Uebertragung von Infectionskrankheiten durch die Luft. II. Mittheilung. *Diese Zeitschrift*. 1897. Bd. XXV. S. 439.

Die mit Pestbacillen ausgeführten Antrocknungsversuche lassen sich folgendermassen zusammenfassen.

D. Pest.

Tabelle VI.

Autor	Cultur- boden	Object der Fixation	Aufbewahrt	Haltbarkeit	
				in Std.	in Tag.
Kitasato ¹	Bubonen- eiter, Serum	Deckglas	28—30° C.	—	4
Wilm ²	—	„	—	—	4 1/2
„	—	„	im Exsiccator	3	—
Abel ³	ver- schieden	verschieden	bei 35° im Brütschr. oder bei 20° im Exsiccator	—	2—3
„		Deckglas	16—20° C.	—	bis 14
„		Fäden, Leinenstücke, Organtheilchen	—	—	30
de Giaksa ⁴	Blut, Eiter	Leinwandstreifen	10—20° C.	—	30
„	„	„	30—35° C.	—	5
Deutsche Pestcommiss. ⁵	—	Wolle, Seidenzeug, Gaze	im Laboratorium	—	6
„	—	Seidenfäden	„	—	5
„	—	Filterpapier	„	—	3
„	—	Glassplitter	„	—	2
Germano ⁶	Bouillon	Staub	im Exsiccator	—	1
„	„	„	lufttrocken	—	3—5
„	„	Zimmerstaub	„	—	1
„	„	Leinwand	„	—	1
„	„	„	im Exsiccator	—	12
„	„	Wollstücken	Zimmerluft und Exsiccator	—	30
„	„	Seidenstücken	Zimmerluft	—	25
„	„	„	im Exsiccator	—	16
„	„	Fliesspapier	in Zimmerluft	—	4
„	„	„	im Exsiccator	—	1

¹ Kitasato. *Preliminary notice of the bacillus of bubonic plague.* Hongkong 1894. July 7.

² Wilm, Ueber die Pestepidemie in Hongkong im Jahre 1896. *Hygienische Rundschau.* 1897. Bd. VII. S. 290.

³ Abel, Zur Kenntniss des Pestbacillus. *Centralblatt für Bakteriologie.* 1897. Bd. XXI. S. 505.

⁴ de Giaksa e Gosio. Referat im *Centralblatt für Bakteriologie.* 1897. Bd. XXII. S. 351. — Gosio, Die Arsenikatur der Zelle in Hinsicht auf die Prophylaxis gegen Bubonenpest. *Hygienische Rundschau.* 1897. Bd. VII. S. 1225.

⁵ Weitere Mittheilungen der deutschen Pestcommission aus Bombay, erstattet am 7. und 26. Mai. *Deutsche med. Wochenschrift.* 1897. S. 501.

⁶ Germano, Die Uebertragung von Infectionskrankh. durch die Luft. IV. Mittheilung. *Diese Zeitschrift.* 1897. Bd. XXVI. S. 281.

Ein Blick auf die angeführten Resultate früherer Arbeiten lehrt uns, dass die mit ein und derselben Spaltpilzart angestellten Trocknungsversuche höchst differente Ergebnisse zu Tage gefördert haben. Wenn der Cholerabacillus beispielsweise, wie aus den Versuchen in der allerersten Zeit nach der Entdeckung hervorgeht, nach wenigen Stunden, nach späteren Mittheilungen aber erst nach über $\frac{1}{2}$ Jahr dem Trocknen erlag, so weist diese Thatsache allein schon darauf hin, dass dies verschiedene Verhalten nicht in den Eigenschaften des Cholerakeims an und für sich, sondern in der verschiedenen Behandlungsweise, die die Keime erfuhren, beruhen müsse. Dass gerade bei bakteriologischen Arbeiten Versuche über denselben Gegenstand in verschiedenen Händen zu verschiedenem Ziele führen, hat wohl immer in dem Wechsel der Versuchsbedingungen seine Begründung, und dieser findet immer statt, wenn zwei dasselbe thun. Aber nicht nur in den Versuchen der verschiedenen, sondern auch bei denen derselben Autoren begegnen wir weitgehenden Differenzen der Resultate. Die meisten Arbeiten gehen auf die Ergründung dieses Umstandes nicht näher ein, andere widmen der Aufklärung der Verschiedenheit der Ergebnisse besondere Versuchsreihen, ohne dass sie indessen ein gesetzmässiges Verhalten constatiren konnten.

Die Bedeutung der früheren Arbeiten soll mit dem Hervorheben der Inconstanz der Bedingungen und Ergebnisse keineswegs geschmälert werden, vielmehr besitzen diese schon deshalb einen hohen Werth, weil ein jeder solcher Laboratoriumsversuch unter Umständen doch einmal durch die Natur in mehr oder weniger ähnlicher Weise wiederholt werden kann. Mit einander verglichen aber zeigen uns die Versuche, dass wir noch nicht am Abschluss der Beantwortung von bisher recht intensiv bearbeiteten Fragen angelangt sind.

Eigene Versuche.

Wie aus einer vergleichenden Betrachtung der Versuchsanordnungen der verschiedenen Autoren hervorgeht, sind geringe Veränderungen der Bedingungen im Stande, ganz gewaltig divergirende Ergebnisse zu zeitigen. Es lag mir daran, einige Momente herauszugreifen, die mitbestimmend für das Endresultat sein konnten, die aber bei den bisherigen Versuchen nicht oder nur beiläufig angedeutet sind. Die Versuche mussten unter einander vergleichbar sein, um den wirksamen Einfluss variabler Bedingungen erkennen zu lassen, ich musste daher so einfach, als es ging, verfahren und Versuchsanordnungen treffen, die mit möglichst wenig Unbekannten rechneten.

Massnahmen zur gleichmässigen Gestaltung der
Versuchsanordnungen.

Von den weiter unten noch näher zu beleuchtenden Momenten, durch deren Variiren man Trocknungsversuche zu den verschiedensten Resultaten führen kann, sind vor allem als bedeutungsvoll hervorzuheben

1. die Menge und Beschaffenheit der zu trocknenden Cultur und
2. die Objecte, an welche die zu untersuchenden Keime fixirt werden sollen.

Dass die Menge und Art der Cultur, mit der wir einen Gegenstand behufs Antrocknung inficiren, von grossem Einfluss auf die Haltbarkeit der Keime sein wird, ist ohne Weiteres klar: wenn man Bouillon-, Gelatine- oder Agartheilchen gleichzeitig mit den Keimen an Objecte überträgt, so handelt es sich dann nicht mehr um die Frage, wie lange widerstehen die Keime an und für sich der Schädigung, sondern vielmehr: wie lange braucht der Nährboden zum Trocknen und wie lange ist er im Stande, die Keime zu schützen. Suspendirt man die letzteren in einer schwer einzutrocknenden Flüssigkeit, vielleicht Glycerinbouillon, oder haften sie an festeren gelatinösen Partikelchen, dann werden sie je nach der Verfassung der plasmatischen Substanz, die wiederum von Quantität und Qualität der dargebotenen Nährstoffe abhängt, die eintretende Wasserverdunstung verschiedenartig ertragen müssen. Damit ist schon angedeutet, dass nicht alle Keime derselben Cultur auf dieselbe Weise reagiren werden; denn ein Keim einer Cultur ist nicht als gleichwerthig seinen Vegetationsgenossen zu betrachten. Die Colonie selbst bietet schon weitgehende Mannigfaltigkeit der Wachstumsbedingungen. So müssen wir für vergleichbare Versuche wohl unterscheiden, ob wir Keime den peripheren oder den centralen Zonen einer Cultur entnehmen. Schon Gruber und Wiener¹ beobachteten, dass Rand und Mitte einer Cholera-cultur ungleiche Virulenz besitzen, indem die aus den mittleren Culturtheilen entnommenen Keime schwächer auf den Meerschweinchenorganismus einwirkten. Wie Gotschlich und Weigang² mit Recht vermuthen, lässt diese Virulenzverschiedenheit auch hier auf eine Verschiedenheit der Individuenzahl sich zurückführen. Bei genauen Keimzählungen von 2^{ms} Culturmasse ergab sich, dass der Keimgehalt der Randzone besonders in den 2 Tage alten und älteren Culturen den der mittleren Partien um ein Be-

¹ Gruber u. Wiener, Cholerastudien. I. *Archiv für Hygiene*. 1893. Bd. XV. S. 241.

² Gotschlich u. Weigang, Ueber die Beziehungen zwischen Virulenz und Individuenzahl einer Cholera-cultur. *Diese Zeitschrift*. 1895. Bd. XX. S. 379.

deutendes überragte, ja dass die Individuenzahl des Randes zu einer Zeit noch in der aufsteigenden Linie sich bewegt, zu der in den centralen Theilen schon erhebliche Wachsthumshemmung sich geltend macht. Bei jungen, bis 20 Stunden alten Culturen liess sich hingegen eine Constanz im Verhalten von Rand und Mitte nicht constatiren, die gesammte Vegetation ist eben um diese Zeit auf der Höhe der Entwicklung. Um Differenzen von dieser Seite ganz aus dem Wege zu gehen, benutzte ich nur Oberflächenculturen auf Agarplatten. Bald nach dem Erstarren des ausgegossenen Agars impfte ich, immer mit derselben federnden Oese, die noch feuchte Oberfläche durch 5 Parallelstriche und erhielt so ein gleichmässig dickes Häutchen. Unter Benutzung dieser Flächencultur war es möglich, eine von Nährsubstanz fast freie Bakterienmasse zu erhalten. Das Abheben derselben geschah, ohne dass das Nährsubstrat verletzt wurde, in vorsichtiger Weise durch Berühren mit Nadel oder Oese. Eine weitere Vorsicht bei dem Bestreben, ein gleichmässiges Ausgangsmaterial von Keimen zu erzielen, wird durch die beim Ueberimpfen oft bemerkbare Thatsache geboten, dass Culturen um so rascher angehen, je jünger das Impfmateriel war. Man wird daher schon zum Anlegen der zu verwendenden Cultur von einheitlichen gleichaltrigen, bei Cholera wohl am besten von 18- oder 20stündigen Agarstrichculturen ausgehen.

Die Constanz des Nährbodens wurde durch die von Prof. F. Hofmann eingeführte Art der Herstellung der Nährmedien erreicht. Diese weicht bei ihrer Einfachheit und bei den hohen Vorzügen in nicht unerheblicher Weise von der in Lehrbüchern mitgetheilten ab und soll an anderer Stelle beschrieben werden. Sie ermöglicht schon dadurch ein gleichartiges Nährmaterial auch für grössere Versuchsreihen, dass das Fleischwasser in grösseren Mengen bereitet wird und dann, auf Bierflaschen gefüllt, sich beliebig lange Zeit vorrätzig halten lässt. Die von dieser gleichen Lösung aus bereiteten Nährböden werden in immer gleichmässiger Weise mit Phenolphthalëin als Indicator neutralisirt. Dass es bei consequenter Beachtung dieser und anderer Vorsichtsmassregeln möglich war, mit einem vergleichbaren Keimmateriel zu arbeiten, beweisen zahlreiche, später anzuführende Keimzählungen: gleiche Quantitäten des auf der Agarfläche gewachsenen Häutchens enthielten immer gleiche Mengen Keime, soweit wir bei bakteriologischem quantitativen Arbeiten von gleichen Zahlen sprechen dürfen; die Schwankungen des Keimgehaltes gleichaltriger Culturen, die in anderen Arbeiten erwähnt werden, habe ich unter diesen Umständen nie beobachten können.

Aber mit dem gleichmässigsten Bakterienmaterial wird man bei Antrocknungsversuchen seinen Resultaten eine verschiedene Wendung geben können, wenn man zum Fixiren der Keime Objecte wählt, welche durch

ihre physikalische oder chemische Beschaffenheit differente Bedingungen schaffen. Der conventionelle Seidenfaden beispielsweise gestattet bei der Durchtränkung mit keimhaltiger Flüssigkeit in den winzigen Interstitien seiner Fäserchen den Bakterien einen Unterschlupf, dessen bergender Schutz nach Art der Fäden und Herstellungsweise schon dem Wechsel unterliegt. Eine bei 140° trocken sterilisirte Kehrriechtmasse andererseits wird bei der Durchfeuchtung mit einer Keimaufschwemmung Stoffe in Lösung übertreten lassen, die unmöglich gleichgültig für das Leben der Bakterien sich erweisen werden. Um diese und ähnliche Beeinflussungen von Seiten der zu inficirenden Objecte zu vermeiden, brachte ich die Culturtheilchen auf Deckgläschen zum Antrocknen, die durch vorheriges, 1/2 Stunden langes Verweilen in einer Chromatmischung (chromsaures Natron 1, 25 proc. Schwefelsäure 4), darauffolgendem ausgiebigen Wässern unter der Wasserleitung und nachherigem öfteren Abspülen mit destillirtem Wasser gereinigt und nach dem Trocknen ausgeglüht wurden. Die Deckgläschen maassen 12 mm², so dass sie mit Leichtigkeit in toto mitsammt der angetrockneten Keimmasse in unsere Culturröhrchen übertragen werden konnten.

Versuche mit Cholera-bacillen.

1. Feststellung der Keimfähigkeit der angetrockneten Cultur.

Die ersten Versuche galten der Vorfrage, wie sich die Prüfung der Entwicklungsfähigkeit der auf den Deckgläschen angetrockneten Cholera-keime am sichersten gestalten liesse.

Es wurden von einer 20^h alten Agaroberflächen-cultur, die von ebenfalls 20^h alter Agarstrich-cultur angelegt war, mittels besonders kleiner Oese kleine Bakterienmengen derart abgehoben, dass die Oese auf das Culturhäutchen ohne Druck sanft aufgelegt wurde, wobei augenscheinlich die gleiche Menge Cultur an derselben haften blieb. Diese wurde auf die mit ausgeglühter Pincette gefassten Deckgläschen aufgetragen und unter leichtem Rühren ausgebreitet. Die so bereiteten Objecte wurden sodann zu 8 oder 9 in sterile Doppelschälchen gelegt, die wiederum in Exsiccatoren Aufnahme fanden. Die letzteren stellte ich mir in der Weise her, dass ich den Boden von 10 cm hohen, 12 cm in der lichten Weite messenden und mit aufgeschliffenem Deckel versehenen Glasdosen — Dosen derselben Art sowie niedrigere sind von Prof. F. Hofmann im Institut seit Langem im Gebrauch zum Aufbewahren geimpfter Platten — mit einer 2 cm hohen Schicht von Chlorcalcium bedeckte und den Deckel durch Bestreichen mit einer Ceratmischung luftdicht aufsetzte. Die Dosen wurden sodann in den Brutschrank bei 25° C. gegeben und waren damit, wie bei allen übrigen Versuchen, vor Licht geschützt. Nach Verlauf bestimmter

Zeit wurden mit steriler Pincette je 3 Deckgläschen aus der Dose entnommen, je eins in eine sterile Platte gegeben und mit Gelatine übergossen („Gelatine I“), ein zweites wurde in ein Röhrchen mit verflüssigter Gelatine gebracht und nach Verreiben der trocknen Culturbröckchen durch die Nadel Platte gegossen („Gelatine II“). Das dritte Deckglas endlich ward in Röhrchen mit Peptonwasser von der bekannten Zusammensetzung übertragen („Peptonwasser“).

+ = letztes positives, 0 = erstes negatives Resultat.

	Gelatine I.		Gelatine II.		Peptonwasser.	
	+	0	+	0	+	0
Vers. 1:	10 ^h	12 ^h	14 ^h	16 ^h	14 ^h	16 ^h
„ 2:	12	15	15	20	15	20
„ 3:	21	24	24	27	24	27

Beim 3. Versuch waren die Platten in Dosen ohne Chlorecalcium gegeben worden.

Wir sehen, dass die Methode des Uebergiessens der eingetrockneten Culturmasse mit Gelatine im Vergleich zu den beiden anderen Verfahren ungünstiger ausfiel, es wurde daher diese Art der Prüfung in der Folge unterlassen. Dass die Gelatine bei der zweiten Art der Handhabung vollkommen gleichwerthig mit der Peptonwassermethode sich erwies, konnte hier und noch bei zahlreichen späteren vergleichenden Beobachtungen constatirt werden: niemals erhielt ich auf der Gelatine ein Ausbleiben der Entwicklung, wenn das Peptonwasser noch anging, so dass ich mich bei der Prüfung auf die eine Methode beschränken durfte. Mit dem Constatiren dieses Befundes soll keineswegs der Peptonwassermethode Abbruch gethan und dem Koch'schen ¹ Satze: „dass die Peptoncultur in Fällen noch positive Resultate giebt, in denen mit dem Gelatineplattenverfahren nichts zu finden war“, schon deshalb nicht widersprochen werden, weil sich derselbe auf die Untersuchung von Fäces bezieht und auch da nur auf besondere, diagnostisch schwierige Fälle, und weil ich mit der Hofmann'schen Gelatine arbeitete, einem Umstande, dem ich ganz besonders die günstige Wirkung auf die Entwicklung auch schon abgeschwächter Cholerakeime zuschreiben möchte: diese Gelatine nämlich gestattet bei einem sehr niedrigen Leimgehalte das Aufbewahren der Platten bei einer Temperatur von 26 und 27° C.

Ich möchte nicht unterlassen, hier noch eine Beobachtung mitzutheilen, die ich bei der Musterung der durch Uebergiessen der getrockneten Cultursubstanz mit Gelatine erhaltenen Platten machen konnte und

¹ R. Koch, Ueber den augenblicklichen Stand der bakteriologischen Cholera-diagnose. *Diese Zeitschrift*. 1893. Bd. XIV. S. 327.

die wohl auch zu Täuschungen führen kann, wenn man die Platten nur makroskopisch betrachtet: es war nämlich oft schon nach 24^h eine von den trockenen Culturbröckchen ausgehende Verflüssigung bemerkbar, die leicht als positives Resultat hätte gedeutet werden können. Im weiteren Verlaufe der Untersuchung stellte es sich heraus, dass das peptonisirende Ferment, das die Cholera-bacillen produciren, auch noch von solchen todtten Bacillenklümpchen aus seine leimlösende Thätigkeit auszuüben im Stande ist.

Um diesen Befund noch sicherer zu stellen, habe ich oft solche in der Gelatinemasse liegenden und verflüssigenden Keimmassen mit dem Deckgläschen herausgehoben und in Peptonwasser oder erneute Gelatine übertragen und Platten gegossen, schon um eventuelle Verunreinigungen im Verflüssigungskreise nachzuweisen: immer war die gelöste Leimsubstanz steril. Eine Angabe in der Litteratur über die peptonisirende Wirkung der durch Austrocknen getödteten Cholera-bacillen habe ich nicht finden können, wohl aber gelang es Fermi¹ diese Fermentwirkung an Cholera-keimen noch festzustellen, die durch die Einwirkung von chemischen Agentien und höheren Wärmegraden, allerdings nicht nachweislich, sondern vermuthlich, abgetödtet waren. Bekanntlich war es Bitter,² der eine verflüssigte normale Gelatine nach Zusatz gewisser Mengen bei 60° C. abgetödteter Cholera-bouilloncultur auch bei der Einwirkung einer Temperatur von 0° nicht wieder erstarren sah. —

2. Einfluss der Dicke der Trockenschicht.

Die nächsten Versuche sollten die Frage entscheiden, ob sich bei dem Auftragen verschieden dicker Culturschichten Schwankungen in den Resultaten zeigen, sowie ob sich diese vermeiden lassen würden.

Um dabei zwei extreme Fälle zu berücksichtigen, wurden

a) von einer 20 stündigen Cultur mittels Berührung derselben durch Platinnadel kleinste Mengen entlehnt, auf Deckglas gegeben und unter Horizontalhalten der Nadel durch leichtes Verreiben mit dem Längsrücken des Drahtes vertheilt, darnach in Schalen und Dosen mit und ohne Chlorcalcium übertragen,

b) ein anderer Theil von Deckgläschen erhielt von derselben Cultur den Inhalt einer etwa 2^{mg} fassenden Oese, der nicht auf der Deckglasfläche ausgebreitet wurde. Weitere Behandlung wie unter a.

¹ Fermi, Die leim- und fibrinlösenden und die diastatischen Fermente der Mikroorganismen. *Archiv für Hygiene*. 1890. Bd. X. S. 3.

² Bitter, Ueber die Fermentausscheidung des Koch'schen Vibrio der Cholera asiatica. *Ebenda*. 1886. Bd. V. S. 241.

Aufbewahren der Dosen bei 25° C. Feststellen der Prüfungsergebnisse durch Peptonwasser.

				a) Deckglas + Nadel		b) Deckglas + Oese	
				+	0	+	0
Vers. 4:	Dose	mit Chlorcalcium:		12 ^h	24 ^h	48 ^h	72 ^h
	„	ohne	„	24	32	36	48
„ 5:	„	mit	„	7	12	54	72
	„	ohne	„	32	36	36	48

Der Unterschied der Keimfähigkeit, den diese beiden Arten der Deckglasinficirung herbeiführten, war demnach erheblich, die Eintrocknung wirkte um so intensiver, je dünnere Culturmassen zum Auftragen gelangten. Wenn dieser Satz auch für nicht so weit differirende Culturschichten wie in den vorliegenden Versuchen gelten würde, so wäre damit eine gleichmässige Gestaltung weiterer Versuche sehr erschwert gewesen. Um diese Frage zu erledigen, wurde das Verhalten der durch zwei Arten der Auftragung minimaler Culturmengen angetrockneten Keime vergleichsweise geprüft: eine Portion Deckgläser wurde wie in Vers. 1 mittels kleiner Oese (I), eine andere wie in Vers. 4 mittels Nadel (II) mit dünnsten Culturschichten versehen. Alles Uebrige wie bei Vers. 4.

				I.		II.	
				+	0	+	0
Vers. 6:	Dose	mit Chlorcalcium:		15 ^h	24 ^h	12 ^h	15 ^h
	„	ohne	„	24	36	20	24
„ 7:	„	mit	„	17	20	15	20
	„	ohne	„	24	36	24	36

Wie man sieht, war ein erheblicher oder constanter Unterschied zwischen diesen beiden Arten der in engen Grenzen differirenden Arten der Vertheilung der auszutrocknenden Culturmengen nicht zu constatiren. Wir dürfen daher die minimalen Schichtenschwankungen, die sich auch bei vorsichtigstem Ausbreiten der Keimmenge nicht vermeiden lassen, als belanglos vernachlässigen.

3. Eintrocknen in gewöhnlicher Luft und im Exsiccator.

Wie aus einer vergleichenden Betrachtung der Lebensdauer in Dosen mit und ohne Chlorcalcium hervorgeht, waren in den Versuchen 4, 5, 6 und 7 die Exsiccatorzahlen immer dann niedriger, wenn die Culturschichten gleichmässig dünn waren, hingegen stieg die Resistenz der Keime im Exsiccator sofort in die Höhe und übertraf die nicht über Chlorcalcium aufbewahrten Bacillen, wenn die Culturmengen compakter waren.

4. Einfluss der Temperatur auf das Austrocknen.

Um den Einfluss festzustellen, den im Verlaufe einer Austrocknung verschiedene Temperaturen auf das Keimleben ausüben könnten, bewahrte ich die mit 2^{mg} unausgebreiteter Cultur (20^h) beladenen Deckgläser in den Dosen bei 37°, 25° und 11° auf. Auf letzteren Grad sinkt die Lufttemperatur in der Dose herab und hält sich constant, wenn die durch Cerat wasserdicht abgeschlossene Dose unter permanentem Leitungswasserbade aufbewahrt wurde.

	37°		25°		11°	
	+	0	+	0	+	0
Vers. 8:	21 ^h	24 ^h	48 ^h	54	77 ^h	96 ^h
„ 9:	24	28	38	48 ^h	82	96
„ 10:	28	36	50	72	72	96

Das Gesetz von der conservirenden Wirkung trockener Kühle tritt auch hier mit aller Schärfe zu Tage, mit steigender Temperatur sinkt die Tenacität des Individuums; je näher das Temperaturoptimum liegt, um so rascher erliegen die Keime den Schädigungen des Trocknens.

5. Verhalten in ruhender und bewegter Luft.

Gelegentlich des Vergleiches zwischen den im Exsiccator und den in der Dose ohne Chlorcalcium deponirten keimbeladenen Deckgläschen liess sich als Ergebniss der Versuche feststellen, dass bei beiden Arten der Austrocknung eine Differenz der Widerstandsfähigkeit zu bemerken war, indem bei gleichmässig dünner Besäung die im Exsiccator befindlichen Keime rascher zu Grunde gingen. Dabei waren die Deckgläschen in einer ruhenden Luftschicht gewesen. Wie verhalten sich nun die Keime bei der Eintrocknung in der schwach bewegten Zimmerluft? — Es wurde eine Dose mit Platten und Deckgläschen (Nadelimpfung) beschickt und mit Glasdeckel versehen, eine Reihe anderer Deckgläschen kamen in Doppelschalen, die frei neben der Dose bei Zimmerluft (16 bis 22° C.) zur Aufstellung gelangten.

Agarcultur 20^h alt. Proben in Gelatine geprüft.

	Dose		frei	
	+	0	+	0
Vers. 11:	22 ^h	26 ^h	16 ^h	22 ^h
„ 12:	28	32	18	22

Der Einfluss der schwach bewegten Luft ist wohl erkennbar, die Keime unterliegen unter dieser Bedingung eher.

6. Einfluss des Alters der Cultur.

Um zu prüfen, ob das Alter der Ausgangscultur von Belang sei, wurden mittels der 2^{ms} fassenden Oese kleine Mengen von verschieden-altrigen Agarculturen weggenommen und in den Exsiccator bei 25° C. gebracht.

	Material von 20 ^h		von 40 ^h alter Cultur	
	+	0	+	0
Vers. 13:	45 ^h	54 ^h	45 ^h	50 ^h
„ 14:	40	45	36	45

Die Exsiccator Dosen bei 37° aufbewahrt:

Vers. 15:	22 ^h	30 ^h	48 ^h	54 ^h
„ 16:	26	30	42	48

Ein Unterschied zwischen 20 und 40^h alter Cultur bestand also nur insofern, als die letztere im Exsiccator bei 37° widerstandsfähiger war. Im Uebrigen dürfen wir annehmen, dass die 1 und 2 Tage alten Culturen dem Austrocknen gegenüber annähernd in gleicher Weise reagiren. Die Verhältnisse gestalten sich aber sofort anders, wenn man ältere Culturen benutzt.

Exsiccator bei 37°, alles Uebrige wie bei Vers. 13.

	20 ^h		72 ^h		5 Tage		7 Tage		8 Tage alte Cultur	
	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0
Vers. 17:	24 ^h	30 ^h	16 ^h	24 ^h	16 ^h	20 ^h	6 ^h	12 ^h	6 ^h	12 ^h
„ 18:	26	30	18	24	12	18	—	—	—	—

Die Zahlen für die von älteren Agarsubstraten abgehobenen Keime blieben auch niedrig, wenn die quantitativen Verhältnisse dabei mehr berücksichtigt wurden. Wenn eine ältere Cultur nur Bruchtheile der Keime einer jüngeren besitzt, so konnte das negative Verhalten der älteren Culturen auch hier in ihrer Keimarmuth begründet sein. Es wurden daher eine grössere Anzahl von Deckgläschen geimpft und aller 2^h je 6 davon aus dem Exsiccator (37°) in 6 Peptonwasserröhrchen gegeben.

	7 Tage alte Cultur		
Vers. 19:	4 ^h + 6 ^h +	8 ^h 0	10 ^h 0

Bei der Entnahme nach 6^h waren 5 Röhrchen angegangen, eins blieb steril.

7. Einfluss der Virulenz der Cultur.

Weiterhin war ins Bereich der Untersuchungen die Frage zu ziehen, ob eine Cultur, die im Vollbesitze pathogener Eigenschaften war, sich gleichermassen wie eine avirulente alte Laboratoriumscultur verhalten würde.

Die sämtlichen bisher angeführten Versuche waren mit einer Cultur angestellt, die ich der Güte des Hrn. Prof. Dr. R. Pfeiffer-Berlin verdanke. Die Cultur, deren Virulenz im Verlaufe der Versuche mehrmals auch bei anderen Gelegenheiten geprüft wurde, besass intraperitoneal einverleibt für Meerschweinchen von 300 bis 350 ^{gr} eine dosis minima letalis von ungefähr. 0.8 ^{mg} 20 stündiger Vegetation und hielt sich bei der häufigen Fortzüchtung auf dieser Höhe. Durch zweimalige Thierpassage schon war die Virulenz auf $\frac{1}{10}$ Oese (= 0.2 ^{mg}) zu steigern: mit dieser letzteren Virulenz kam die Cultur für den vorliegenden Versuch zur Verwendung. — Zum Vergleich wurde eine avirulente bzw. weniger virulente Cholera-cultur benutzt, von der bis zu 6 Oesen Meerschweinchen von etwa 300 ^{gr} ohne wahrnehmbare Schädigungen ertrugen.

Culturen 20^h. Nadelimpfung. Exsiccator bei 25°. Proben in Peptonwasser.

	virulent		avirulent	
	+	0	+	0
Vers. 20:	28 ^h	32 ^h	18 ^h	20 ^h
„ 21:	30	32	—	18

Die erhöhte Haltbarkeit hochvirulenter Cholerakeime beim Austrocknen geht aus diesen Versuchen deutlich hervor.

Betrachten wir nun die Ergebnisse etwas näher, so finden wir, dass für den Ausfall von Trocknungsversuchen eine Reihe verschiedener Factoren in Betracht und dann zum scharfen Ausdruck kommen, wenn einige Unbekannte bei den Versuchen dadurch eliminirt wurden, dass das Austrocknungsmaterial eine gleichmässige, von Nährboden fast freie Bakterienmasse war und wenn zum Fixiren die indifferente Deckglasfläche zur Verwendung kam.

Die Prüfung der Widerstandsfähigkeit muss so geschehen, dass die in ihren vitalen Eigenschaften geschwächten Mikroorganismen in dem dargebotenen Nährmedium optimale Verhältnisse vorfinden. Mit der blossen Feststellung der Abschwächungsschwelle ist bei der Prüfung physikalischer und chemischer Einwirkungen nicht viel geholfen, wir wissen ja gar nicht, ob eine Keimart, wenn auch erst nach langen Generationen, sich erholen und die alten Fähigkeiten wieder erlangen kann. Es muss daher unser Augenmerk auf den Entscheid der Frage gerichtet sein, ob und zu welcher Zeit die Keime von der wirksamen Kraft dermassen influirt werden, dass sie auch unter den günstigsten Bedingungen die wichtigste Lebensäusserung, die Vermehrung, nicht mehr zu entfalten im Stande sind. Dass es für die inmitten eines eintrocknenden Culturklümpchens gelegenen, etwa noch überlebenden, aber geschwächten Bakterien ein Anderes ist, ob der ganze Brocken mit der bald erstarrenden Gelatine

übergossen wird oder ob man die Masse, ehe sie der Platte übergeben wird, verreibt, haben wir oben gesehen. Desgleichen wird das Befeuchten der auf dem Deckglas eingetrockneten Cultur mit einem Tröpfchen Bouillon und Constatiren des mikroskopischen Verhaltens nach bestimmter Zeit — welche Methode z. B. in den früheren Arbeiten über Austrocknung öfters gehandhabt wurde — einen Unterschied hinsichtlich des Resultates ergeben müssen gegenüber dem Uebertragen in Bouillon- oder Peptonwasserröhrchen, in denen man die sich gründlich durchfeuchtenden Theilchen auseinanderschüttelt und so die Stoffwechselproducte in weitgehendem Maasse verdünnt. Und mühelos lässt sich auch, wenn wir es nicht speciell beweisen, schon aus unserer Beobachtung ableiten, dass die im Innern eines Seidenfadens geborgenen Keime, um die herum die Wände der Fäserchen und vielleicht eingetrocknete Bouillonresttheilchen oder abgestorbene Keimmengen einen schützenden Wall bilden, nun nicht sofort ihr Vermehrungsgeschäft wieder aufzunehmen vermögen, wenn man den Faden mit Gelatine übergiesst oder, wie es in früheren Versuchen ebenfalls angegeben wird, auf eine trockene oder trocknende Agarfläche legt. Daraus folgt zugleich, dass auch die Dauer der Beobachtung wichtig sein wird, genau so wie das für Desinfectionsversuche längst constatirt ist. Wir selbst konnten bei den günstigen Verhältnissen, in die wir die Keime versetzten, einen Einfluss von dieser Seite nicht bemerken; wenn nach 48 bis 60^h weder im Peptonwasser noch in der Gelatine Wachsthum ersichtlich war, so blieben diese Medien steril, auch wenn die Musterung bis 14 Tage und länger fortgesetzt wurde.

• Dass die Dicke der aufgetragenen Culturschicht eine Rolle spielt, auch wenn die trocknende Masse fast nur aus Keimen besteht, erhellt ebenfalls aus den angeführten Versuchen. Wie viel mehr wird dieser Umstand sich da Geltung verschaffen, wo gleichzeitig mit den Keimen Nährboden übertragen wird, wo nicht zunächst die Keime, sondern vielleicht die gelatinöse Masse vorerst zur Wasserabgabe gezwungen wird und durch Schrumpfen den innen befindlichen Keimen eine deckende Hülle bereitet.

Nicht minder einflussreich ist die Geschwindigkeit des Trocknens. Wenn einige Autoren fanden, dass das Eintrocknen im Exsiccator rasch zum Tode führt, während von anderen Beobachtern eine erhebliche Verzögerung des Absterbens unter diesen Bedingungen festgestellt wurde, so ist für dies verschiedene Verhalten die Erklärung durch obige Versuche leicht abzugeben. Die für das Eintrocknen im Exsiccator ermittelten Werthe waren niedriger, wenn die Schichten gleichmässig dünn ausgebreitet waren oder nur geringe Dickendifferenzen aufwiesen. Die Resistenz im Exsiccator war jedoch sofort eine höhere und übertraf diejenige der

in gewöhnlicher Luft aufbewahrten Keime, wenn eine grössere Bakterienmasse auf die Deckgläschen gegeben wurde. Es bildet sich eben dann auf einer solchen dickeren Lage eine mehr ausgetrocknete Haut, welche wie eine trockene Epidermisschicht das Abdunsten des Wassers aus der Tiefe in hohem Maasse verzögert.

Die austrocknende Fähigkeit einer Luft ist von der Temperatur abhängig und somit eine mit derselben variirende Grösse. Schon aus diesem Grunde wird je nach der Höhe der Temperatur sich ein differentes Verhalten der Keime offenbaren. Das geht auch aus den mitgetheilten Versuchen hervor. Inwieweit aber innerhalb dieser constatirten Thatsache der schnelleren oder langsameren Austrocknung eine Rolle zukam in Vergleich zu den anderen, mit dem Temperaturwechsel eintretenden biologischen Veränderungen, die für die Existenz der Bakterienzelle von Belang waren, mag hier nicht entschieden werden. Auch diese Abhängigkeit der Ergebnisse von der Temperaturhöhe ist in früheren Versuchen fast ganz vernachlässigt worden, erst bei den kürzlich erfolgten Ermittlungen über das Verhalten der Pestbacillen fand diese Frage eingehendere Berücksichtigung.

Dass es zum Erzielen gleichmässiger Bedingungen nöthig war, die Austrocknung in ruhender Luftschicht vorzunehmen, geht ebenfalls aus den Versuchen hervor. Bewegte Zimmerluft, die wie jeder Luftwechsel den Wasserdampf rasch hinwegführt, wird sich an verschiedenen Punkten desselben Raumes jeweilig verschieden verhalten und sich daher ungleich geltend machen müssen. Auch diesem Umstande ist in verschiedenen Versuchen von früher wenig Bedeutung beigemessen, wir sehen die Objecte bald in einem Schrank, bald unbedeckt, bald unter der Glasglocke mit oder ohne Lüftung aufbewahrt, bald fehlt jegliche Angabe darüber.

Dass das Alter der Cultur mit massgebend für den Endeffect ist, habe ich ebenfalls nachweisen können. Ich stelle mich damit in Gegensatz zu verschiedenen Autoren, die das Gegentheil fanden. Dass man diese Frage z. B. mit den üblichen Seidenfäden nicht entscheiden kann, erscheint mir nach meinen Erfahrungen wohl erklärlich.

Die Frage, ob virulente oder weniger virulente Cholerakeime bei Eintrocknung sich verschieden resistent zeigen, scheint noch nicht ventilirt worden zu sein. Berckholtz verglich zwar alte Laboratoriumsculturen mit einigen aus verschiedenen Epidemien gezüchteten Stämmen, doch zog er die Virulenz hierbei nicht in Betracht. Nach dem von Smirnow¹ gelieferten Beweis, dass die Empfindlichkeit z. B. gegen Des-

¹ Smirnow, Ueber das Wesen der Abschwächung pathogener Bakterien. *Diese Zeitschrift*. 1888. Bd. IV. S. 231.

infectionsmittel sich proportional dem Grade der Abschwächung steigern, war ja auch bei der Schädigung durch Eintrocknen bei den weniger virulenten Keimen eine geringere Haltbarkeit zu erwarten, indessen, wie wir weiter unten sehen werden, braucht das Verhältniss zwischen Virulenz und Resistenz keineswegs immer so wie hier sich zu gestalten.

Wie aus den mitgetheilten Versuchen hervorgeht, kann schon die Verschiebung nur eines der in Betracht kommenden Momente unter strenger Beobachtung einheitlicher und gleichmässiger anderer Umstände beträchtlich differirende Endresultate zu Tage fördern, wie gross müssen dann erst diese Differenzen sich erweisen, wenn durch ungleiches Verhalten einiger Factoren oder durch die Combination derselben unberechenbare und unvergleichbare Bedingungen geschaffen werden. So sei erwähnt, welche Unsummen von Möglichkeiten dadurch geboten wird, dass man in Versuchen mit den Keimen zugleich verschiedenartige und verschieden grosse Mengen von Nährmaterial mit überträgt, dass man Lichtabschluss nicht oder nicht völlig herbeiführt oder dass man das auszutrocknende Material an mehr oder weniger differente Objecte fixirt.

Im Spiegel solcher Betrachtungen wird uns die Verschiedenartigkeit der Versuchsergebnisse erklärbar erscheinen, wir merken dann, dass die Natur auch hier keinen „Sprung“ gemacht, sondern dass sie bei gleichen Bedingungen gleichmässigen Schrittes geht.

Austrocknung und wechselnde Feuchtigkeit.

1. Cholera.

Es wurde oben constatirt, dass dünnste Keimschichten bei schwach bewegter Luft eher zu Grunde gingen. Wir versuchten das damit zu erklären, dass eine bewegte Luft rascher trocknend wirkt als die unbewegte Luftsäule der Dose, sowie man das Lufttrocknen eines zu färbenden Deckglaspräparates auch eher erreicht, wenn man dasselbe nicht ruhig liegen lässt, sondern durch Hin- und Herschwenken mit einer grösseren Menge von Luftmoleculen in Berührung bringt. Berckholtz wirft nun in der oben citirten Arbeit zur Erklärung derselben von ihm beobachteten Erscheinung die Frage auf, ob nicht die geringere Widerstandsfähigkeit im lufttrockenen Zustande vielmehr durch die in der äusseren Luft vorkommenden Feuchtigkeitsschwankungen bedingt seien. Die folgenden Versuche widmen sich dieser Frage. Es wurden eine Anzahl Deckgläschen einem Exsiccator übergeben, in dem sie bis zur Probeentnahme verblieben. Mit einer anderen Partie wurde ein zweiter Exsiccator beschickt, aus welchem die Platten nach Verlauf von 2^h in eine feuchte Kammer ge-

bracht, hier 2^h belassen, darnach wieder in den Exsiccator zurückgegeben wurden u. s. w.

Agarcultur 20^h. Nadelimpfung. Dosen bei 25°. Prüfung durch Peptonwasser.

	Nur Exsiccator		Wechselnde Feuchtigkeit	
	+	0	+	0
Vers. 22:	14 ^h	24 ^h	—	10 ^h
„ 23:	16	24	10 ^h	12

Die zwischen Extremen schwankende wechselnde Feuchtigkeit hatte demnach in der That einen nachtheiligen Einfluss ausgeübt.

Dies Verhalten der im Exsiccator befindlichen Keime bei Einwirkung erneuter Feuchtigkeit wurde nun auch bei anderen Keimarten untersucht, wobei gleichzeitig die Mikroorganismen in dem einen Exsiccator ganz der Eintrocknung überlassen wurden, damit nicht nur ein Vergleich mit den weiterhin befeuchteten, sondern auch mit den Ergebnissen früherer Austrocknungsversuche geschaffen würde. Die Befeuchtung geschah hierbei mittels Uebertragens einer kleinen Oese sterilisirten Leitungswassers.

2. Typhus.

Die Cultur, aus frischer Milz gezüchtet, besass die Virulenz von 0.5 bis 0.3^{ms} auf 1 Tag alter Agarplatte. Die Deckglasproben gelangten zur Prüfung der Keimfähigkeit in Bouillon, wenn diese anging, wurden zur Sicherstellung Platten gegossen.

Cultur 24^h. Nadelimpfung. Befeuchten bei Tage aller 3^h. Aufbewahrt bei 25°.

	Wechselnde Feuchtigkeit		Exsiccator	
	+	0	+	0
Vers. 24:	9 ^h	21 ^h	4 Tage	5 Tage

Vers. 25: Cultur 24^h. Impfen der Deckgläser mit kleiner Oese und gleichmässige Ausbreitung. Vers. 26: 14 Tage alte Cultur, Auftragen wie bei Vers. 25. Cultur noch lebenskräftig (1 kleine Oese = 8 bis 10000 Keime). Befeuchten aller 4^h.

	Wechselnde Feuchtigkeit		Exsiccator	
	+	0	+	0
Vers. 25:	3 Tage	3 Tage 10 ^h	9 Tage	10 Tage
„ 26:	4 ^h	8 ^h	2 „	3 „

3. Diphtherie.

Cultur aus frischem Fall gezüchtet, Virulenzprobe positiv.

Von 24^h alter Cultur auf Platte mit Löffler'schem Serum wurden mittels Oese wie oben dünnste Schichten auf Deckgläschen aufgetragen.

Befeuchtung: 2 Mal täglich. Prüfung: Uebertragen des ganzen Deckglases in Serumröhrchen, Vertheilen des Keimmateriales durch die im Presswasser angefeuchtete Oese.

	Wechselnde Feuchtigkeit		Exsiccator	
	+	0	+	0
Vers. 27:	5 Tage	6 Tage	14 Tage	15 Tage
„ 28:	6 „	7 „	16 „	19 „
„ 29, Cultur 5 Tage alt:	3 „	4 „	11 „	12 „

4. Pest.

Die Cultur hatte ich durch die Liebenswürdigkeit von Hrn. Geheimrath Flügge erhalten.

Versuchsanordnung wie bei Diphtherie.

Cultur auf Glycerinagar. Befeuchten 2 Mal täglich. Prüfung: Einführen des ganzen Deckglases in Bouillon, falls diese anging, Platten mit Gelatine gegossen.

	Wechselnde Feuchtigkeit		Exsiccator	
	+	0	+	0
Vers. 30, Cultur 24 ^h :	20 ^h	28 ^h	8 Tage	9 Tage
„ 31, „ „	24	36	9 „	11 „
„ 32, „ 36 ^h :	36	48	11 „	12 „

Die Versuche ergeben übereinstimmend, dass intensivem Trocknen ausgesetzte Keime, wenn sie aufs Neue eine Wasserzufuhr erfahren, erheblich rascher ihre Entwicklungsfähigkeit einbüßen, als wenn sie dem steten Austrocknen überlassen bleiben. Ich hatte das Umgekehrte erwartet und mir gedacht, dass eine neue Benetzung die Lebensthätigkeit günstig beeinflussen, dass das Plasma sich erholen würde, um dann um so kräftiger der Schädigung des Wasserverlustes sich zu wehren und wenigstens längeren Widerstand zu leisten, als die im Exsiccator belassenen Bakterien. Statt dessen sehen wir zumal bei Typhus- und Pestbacillen eine beträchtlich ungünstigere Beeinflussung durch die Wasserzugabe. Ob die letztere besondere osmotische Druckverhältnisse herbeiführt, vielleicht derart, dass die durch die vorausgehende Wasserentziehung in ein Stadium geringster Turgescenz oder in einen plasmolytischen Zustand versetzte Bakterienzelle bei plötzlicher Wasserdarbietung wieder anschwillt, die Zellwände aber diesem mächtigen Drucke nun nicht mehr gewachsen sind und bersten, wage ich, da mir durch directe Beobachtung gewonnene Beweise mangeln, nicht zu entscheiden. Wie aber auch die Erklärung dafür gefunden werden möge, dass das Plasma unter solchen Verhältnissen seiner vitalen Eigenschaften schon sehr früh beraubt wird, so darf das wohl mit Sicher-

heit vermuthet werden, dass für gewisse Arten von Mikroorganismen dieser Modus der Zellvernichtung, die aus dem Wechsel von Trocknung und Feuchtigkeit resultirt, ein in der Natur ungeheuer verbreiteter sein wird.

B. Verhalten von Cholerakeimen in der feuchten Kammer.

Bei einigen im vorigen Abschnitte angeführten Versuchen waren zum Vergleich mit den im Exsiccator eintrocknenden Culturmassen ebenso beladene Deckgläschen in eine zur feuchten Kammer umgewandelte Dose gegeben worden. Die Ergebnisse der Prüfung dieser so behandelten Keime seien hier angeführt, wobei zum Vergleich die schon unter Vers. 5, 6 und 7 gebrachten Zahlen daneben gestellt werden sollen.

Cultur 20^h. Nadelimpfung. Aufbewahren bei 25° C. Proben in Peptonwasser.

	Exsiccator		Feuchte Kammer	
	+	0	+	0
Vers. 33:	7 ^h	12 ^h	7 ^h	12 ^h
„ 34:	15	24	15	24
„ 35:	17	20	20	24

(Impfen mit kleiner Oese.)

Es hatten sich demnach in der feuchten Kammer die Keime nur ebenso lange, in einem Falle sogar nicht so lange wie die im Exsiccator befindlichen entwicklungsfähig erhalten. Dieser sonderbare Befund war die Veranlassung, dem Verhalten der Keime in der feuchten Kammer weiter nachzuspüren.

1. Verhalten in der feuchten Kammer bei verschiedenen Temperaturen.

Von einem 20^h alten Plattenstrich (Agar) wurden mittels Oese kleine Mengen entnommen und auf Deckgläser gegeben, und zwar kam auf jedes Gläschen die gleiche Menge vom Inhalt dreier kleiner Oesen, so dass, wie durch Wägungen festgestellt wurde, die Gewichtsmenge etwa 5^{mg} Cultur betrug. Die so beladenen Gläschen wurden sofort in Schalen und diese in die als feuchte Kammer dienenden Dosen gegeben, von denen die einen auf Eis, die anderen bei 11°, 25° und 37° C. aufbewahrt wurden. Die Prüfung der Lebensfähigkeit geschah durch Uebertragen kleiner Mengen des Culturhäufchens mittels Oese in Peptonwasser. Wenn das letztere nach 24 bis 36^h steril blieb, wurde alsbald zur Sicherstellung des Resultates das ganze Deckglas in Peptonwasser übertragen oder in Gelatine-röhrchen gebracht und Platte gegossen. Der positive Ausfall des Pepton-

wassers wurde zumeist durch Gelatineplatten controlirt, bei grösseren Versuchsreihen begnügte ich mich mit Anfertigen eines hängenden Tropfens, dessen schnell bewegliche Vibrionen bei dem eigenartigen Geruch des angegangenen Peptonwassers nur Choleravibrionen sein konnten.

		Dose α 0° C.		Dose β 11° C.	
		+	0	+	0
Cultur 48 ^h	Vers. 36:	42 Tage	47 Tage	37 Tage	42 Tage
	„ 37:	39 „	42 „	29 „	33 „
	„ 38:	57 „	—	64 „	—
	„ 39:	71 „	—	72 „	—
		Dose γ 25° C.		Dose δ 37° C.	
		+	0	+	0
Cultur 48 ^h	Vers. 36:	7 Tage	10 Tage	30 ^h	36 ^h
	„ 37:	9 „	12 „	27	48
	„ 38:	72 „	—	50	3 Tage
	„ 39:	122 „	—	3 Tage	4 „

Die Versuche 38 und 39 sind zum Theil unvollständig, indem die Endresultate nur theilweise bestimmt werden konnten: die Deckgläschen gingen schliesslich zur Neige, da die Versuche sich lange hinausdehnten, was nicht erwartet wurde.

Die eingehendere Besprechung der eben mitgetheilten Ergebnisse soll später erfolgen. Was zunächst bei einer Vergleichung derselben in die Augen springt, ist die ganz ausgesprochene Abhängigkeit der Resistenz vom Alter der Cultur. Diesem Umstande wurden weiterhin zahlreiche Versuche gewidmet.

2. Verhalten der Keime verschiedenaltiger Culturen in der feuchten Kammer.

In den nachfolgenden Versuchen wurden die Keime in der feuchten Kammer nur bei 37° beobachtet, da, wie aus obigen Versuchen ersichtlich ist, die Lebensdauer bei dieser Temperatur eine viel kürzere als bei niedrigeren Temperaturen ist und in Folge dessen zahlreichere Controlversuche angestellt werden konnten. Da es in hohem Grade umständlich gewesen wäre, wenn für jede der zahlreichen Probeentnahmen ein Deckglas hätte hergestellt werden sollen, so wurde reichliche Cultursubstanz aufgetragen, um die Prüfung mittels Abhebens kleiner Mengen durch Oese vornehmen zu können. Wie schon oben erwähnt, erhielten die Deckgläschen immer annähernd 5^{mg} Bakterienmasse.

Die Berichte über die Versuche mit verschiedenaltigen Choleraculturen sollen zunächst summarisch gegeben werden. Es sind diesen Tabellen sämtliche Versuche eingereiht, die mit den Culturen von dem betreffenden Alter überhaupt zur Ausführung kamen, gleichgültig zu welchem Zweck und mit welcher Variation. Aus diesem Grunde sind in den Ergebnissen Schwankungen bemerkbar, die jedoch die Beantwortung der hier gestellten Frage in keiner Weise beeinträchtigen.

Tabellen der Haltbarkeit der von verschiedenaltigen Culturen abgehobenen Cholerakeime in der feuchten Kammer.

Tabelle VII.

Alter d. Cultur:	24 ^h		48 ^h		3 Tage		5 Tage	
	+	0	+	0	+	0	+	0
	32 ^h	36 ^h	3 Tg.	4 Tg.	8 Tage	9 Tage	9 Tage	10 Tg.
	26	34	5½ „	6 „	12 „	14 „	15 „	19 „
	30	48	50 ^h	3 „	11 „	14 „	14 „	19 „
	27	35	58 ^h	60 ^h	13 „	15 „	Versuche 66—68	
	16	28	54 ^h	3 Tg.	8 „	9 „		
	18	24	6 Tg.	7 „	Versuche 61—65			
	30	36	7 „	8 „				
	27	32	Versuche 54—60					
	22	28						
	21	28						
	22	24						
	24	30						
	42	60	Versuche 41—53					

Versuche mit Keimen noch älterer Culturen ergaben folgende Haltbarkeitswerthe:

Tabelle VIII.

Nr. des Versuches	Alter der Cultur in Tagen	+	0
69	7	50 Tage	nicht ermittelt
70	8	49 „	„
71	8	52 „	„
72	11	32 „	„
73	12	38 „	„
74	16	34 „	„
75	17	32 „	„
76	21	50 „	„
77	21	50 „	„
78	21	50 „	„

Aus äusseren Gründen konnte leider in den Versuchen 69 bis 78 die Lebensdauer der Keime nicht bestimmt werden, die angeführten Zahlen bedeuten also noch keineswegs die obere Grenze.

Fassen wir die gefundenen Zahlen in Mittelwerthen zusammen, so ergibt sich, dass das Absterben der Keime in der feuchten Kammer,

wenn die Cultur 20—24^h alt war, zwischen 26 und 35^h erfolgte,

„	„	„	48 ^h	„	„	„	4	„	5	Tagen	„
„	„	„	72 ^h	„	„	„	10	„	12	„	„
„	„	„	5 Tage	„	„	„	13	„	16	„	„

Mit Hinblick auf die nicht erheblichen, aber doch deutlichen Differenzen einzelner in den Tabellen mitgetheilte Beobachtungen, wurde in der Folge geprüft, ob man auch hier unter Innehaltung ganz gleichmässiger Versuchsbedingungen nur geringen Schwankungen unterworfenen Werthe erhalten würde. Es wurden gleichzeitig 8 Platten mit derselben Agarmenge beschickt und auf dieselbe Art besät. Nach 1, 2, 3 und 8 Tagen wurden von denselben je 2 Oesen auf je ein Deckglas gegeben. Die Deckgläschen wurden in der feuchten Kammer bei 37° aufbewahrt. Die Ergebnisse dieser Versuche, die schon oben mit angeführt sind, sollen vergleichsweise hier neben einander gestellt werden.

Alter der Cultur							
24 ^h		48 ^h		72 ^h		8 Tage	
+	0	+	0	+	0	+	0
30 ^h	36 ^h	50 ^h	3 Tage	11 Tage	14 Tage	49 Tage	
27	32	58	60 ^h	13 „	15 „	52 „	

Die Werthe stimmen also gut überein.

3. Einfluss der Menge des Nährbodens.

Es wurde fernerhin untersucht, wie sich die auf verschiedenen dicken Agarschichten gewachsenen Keime in der feuchten Kammer verhalten würden.

Zu diesem Zweck wurden in je 2 Schalen von 2^{cm} Höhe und 7·5^{cm} Durchmesser je 5^{ccm} verflüssigten Agars, in 2 andere je 40^{ccm} desselben Nährsubstrates gegeben so dass die ersteren mit einer etwa 1½^{mm}, die andere mit einer 12^{mm} dicken Agarschicht versehen waren. Von diesen mit Cholera geimpften Platten wurden nach 24^h, 3, 5, 10 und 21 Tagen mit je 2 Oesen Deckgläschen beschickt und in die feuchte Kammer bei 37° gegeben.

Alter der Cultur		auf dünner		auf dicker Agarschicht	
		+	0	+	0
Vers. 79:	24 ^h	16 ^h	18 ^h	18 ^h	26 ^h
	3 Tage	23	30	8 Tage	9 Tage
	5 „	4 ¹ / ₂ Tage	5 Tage	10 „	11 „
	10 „	12 „	14 „	15 „	19 „
	21 „	50 „	—	50 „	—

Ehe wir uns der Besprechung der Resultate zuwenden, soll noch die Beantwortung der Frage in Angriff genommen werden, wie lange sich die von jungen und älteren Culturen abgehobenen Spaltpilze in der feuchten Kammer nach Zugabe von kleinsten Mengen Nährsubstanz widerstandsfähig zeigen würden.

4. Verhalten der Keime bei Zugabe kleinster Nährstoffmengen.

3 Oesen Cultur wurden in sterilisirte Uhrschildchen gebracht und zu der Bakterienmasse ein 0.06^{cem} messender Tropfen steriler Bouillon zugegeben. Die Uhrschildchen kamen in Platten und feuchte Kammern bei 37°. Zum Vergleich wurden die gleichen Mengen Cultur in Uhrschildchen ohne Bouillonzusatz beobachtet.

Alter der Cultur		Mit Bouillon		Ohne Bouillon	
		+	0	+	0
Vers. 80:	24 ^h	6 ³ / ₄ Tage	8 Tage	46 ^h	54 ^h
	24	4 „	7 „	36	40
	72	60 „	—	8 Tage	9 Tage
	6 Tage	140 „	—	46 „	—
	12 „	140 „	—	38 „	—

Gehen wir nun an der Hand der Versuchsergebnisse auf das Verhalten der von ihrem Nährsubstrate losgelösten Cholerakeime in der feuchten Kammer etwas näher ein.

Dass die in dünnsten Schichten zur Auftragung gelangten Culturtheilchen (Vers. 33 bis 35) in der feuchten Atmosphäre ebenso rasch und noch eher zu Grunde gingen wie im Exsiccator, findet wohl eine einfache Erklärung darin, dass durch die beim Beschicken des Deckgläschens erfolgende Eintrocknung schon ein schwächendes Moment herbeigeführt wird, so dass dann, ähnlich wie bei dem oben erörterten Verhalten in wechselnder Feuchtigkeit, durch die feuchte Luft eher eine Schädigung herbeigeführt wird. Auffallender Weise jedoch verlängerte sich die Lebensdauer in gar nicht bedeutendem Maasse, als anstatt der dünnsten Schichten 3 Oesen Cultursubstanz, die während der Zeit des Uebertragens vollständig feucht blieb, in der feuchten Kammer sich selbst überlassen wurden. Die

Versuche (36 bis 39), die das feststellten, geben zugleich einen wichtigen Einblick in die inneren Verhältnisse in einem solchen Bakterienhäufchen. Wenn dasselbe bei einer im Uebrigen gleichen Behandlungsweise vier verschiedenen Temperaturen übergeben wurde, so konnte eine ganz weitgehende Divergenz der Conservirung der Lebensdauer constatirt werden. Während beispielsweise in dem einen Falle schon nach 30 bis 36^h langem Verweilen des vor Trocknung geschützten Keimmateriales bei 37° dasselbe lebensfähige Individuen nicht mehr enthielt, war bei 25° eine 7 Mal längere (7 bis 10 Tage), bei 0° eine 30 Mal längere (42 bis 47 Tage) Andauer des Entwicklungsvermögens wahrzunehmen. Dieses ganz und gar von der Temperatur abhängige Verhalten, das in paralleler Weise auch bei den der 48^h alten Cultur entnommenen Mikroben (Vers. 38, 39) im Anfange sich geltend macht, findet nur seine Erklärung in der durch die verschiedene Temperatur geschaffene Verschiedenartigkeit der biologischen Verhältnisse. Und die ganze Rolle, welche die Temperatur für den Lebensprocess der Mikroorganismen spielt, wie wird sie klar gekennzeichnet, wenn wir sehen, dass unsere Keime gerade bei den dem Optimum nächstliegenden Wärmegraden, bei welchen sie sonst sich im Vollbesitze ihrer Leistungsfähigkeit befanden, rapid zu Grunde gehen und im Gegensatz dazu bei den Temperaturen, die nachgewiesenermassen jede höhere Leistung der Zelle zu unterdrücken vermögen, eine ausserordentliche Haltbarkeit bewiesen. Das lehrt uns doch, dass die Temperatur nur ein Anstoss, ein Reiz ist. Und wo die Reizbarkeit des Plasmas, wie bei niedriger Temperatur, aufgehoben oder vermindert ist, wird das Leben sistirt: es tritt gewissermassen eine Kältestarre ein, in welchem Zustande bei Erhaltung des Lebens eine intensivere Ausübung vitaler Functionen unterbleibt und das Plasma in einen trägeren, stabilen Ruhezustand übergeht. Im Gegensatz hierzu wirkt für die bei höherer und optimaler Temperatur belassenen Keime die letztere als formaler Reiz: so lange noch Spuren von Nährmaterial zur Verfügung stehen, so lange dauert unter dem Einflusse dieses Reizes die productive vitale Thätigkeit der lebenden Substanz ungestört fort. Diese hatte sich bisher auf der Agarfläche als zweckmässig erwiesen, die neuen Verhältnisse ändern an dieser Thätigkeit nichts, der Temperaturreiz dauert fort, deshalb verarbeitet die Zelle, vor Trocknung geschützt, in der alten Weise fürs Erste das noch vom Agar bezogene und mitgeführte Nährmaterial weiter. Doch bald sind die von früher her disponiblen Energiequellen erschöpft, die Zelle versäumte bei ihrer nur auf die Vermehrung gerichteten Thätigkeit plastische Stoffe zu speichern, sie hungert und consumirt ihre eigene Leibessubstanz — andererseits aber wurden bei dem lebhaften Stoffwechsel Zersetzungsproducte in reicher Menge geliefert. Diese stauen sich nothwendig an und müssen

dem Plasma zum Verderben gereichen, sei es, dass sie das Leben desselben activ vernichten, sei es, was wahrscheinlicher ist, dass sie ein Weiterleben zur Unmöglichkeit machen durch Verhinderung der zur Existenz unbedingt nothwendigen Ausscheidung von neuen Spaltungsproducten, genau so wie die mit Stoffwechselresten beladene Körperzelle urämisch erstickt.

Wie schon aus der vergleichenden Betrachtung der zum Zweck des entscheidenden Einflusses der Temperatur angestellten und ebenso aus den dieser Frage besonders gewidmeten Versuchen hervorgeht, ist für die Haltbarkeit der von dem Nährsubstrat abgelösten Keime in der mit Feuchtigkeit gesättigten Atmosphäre, in ähnlicher Weise wie die Temperatur, das Alter der verwendeten Cultur von ausschlaggebender Bedeutung. So finden wir, dass die bei 37° gehaltenen, der 24stündigen Agarplatte entnommenen Keime nach 30 bis 32^h, die der 48^h alten nach 50 bis 60^h, die der 72^h alten nach 11 bis 14 Tagen und die der 8 Tage alten noch nach 50 Tagen lebensfähig waren, ohne dass damit im letzteren Falle die obere Grenze der Resistenz erreicht gewesen wäre. Diese That- sachen werfen ein Licht auf die biologischen Verhältnisse, wie sie für die in verschiedenaltigen Culturen vorhandenen Mikroorganismen obwalten.

Dass die auf 20 bis 24^h alten Agarflächen gewachsenen Cholera- keime auf dem Gipfel ihrer Leistungsfähigkeit und damit auf der Höhe der Resistenz stehen, ist eine überall anzutreffende Anschauung, mit zu- nehmendem Alter soll dann die Zelle an Widerstandskraft verlieren. Dieser Erfahrung scheinen obige Versuche zu widersprechen, denn gerade die den älteren Culturen entnommenen Spaltpilze bewahrten das Keimvermögen unter den gegebenen Bedingungen am längsten, während die jungen Keime von der vermeintlichen höheren Resistenz binnen Kurzem zu Grunde gingen.

Die 2 Tage alte Cultur verhält sich, wie die Versuche zeigen, schon wesentlich anders wie die 24stündige. Die erstere enthält, wie Gotschlich und Weigang in der oben citirten Arbeit feststellten, nur noch 12 Procent der in der 20 Stunden alten vorhandenen Keime: dieses rapide Zugrunde- gehen erklären die genannten Autoren mit der Erschöpfung des Nähr- bodens, die eine Folge der unter den günstigen Temperaturverhältnissen erfolgten maximalen Entfaltung der Lebensäusserungen unserer Keime ist. In der That musste auch oben dem eintretenden Hunger die Hauptrolle beigemessen werden, der dort bei der mit Abhebung vom Nährboden erfolgten Nahrungsentziehung, noch viel eher eintreten musste und eine Dissimilation der noch lebenden Plasmasubstanz zur Folge haben konnte. Ich möchte aber auch die Bedeutung der Stoffwechselproducte — welches Wort freilich oft zum Schlagwort geworden ist — ausdrücklich hervor- heben und für die hohe Haltbarkeit, die wir mit steigendem Alter der

Cultur wahrnehmen konnten, die Summe zweier Factoren verantwortlich machen: Die Anpassung an den eintretenden Nahrungsmangel, sowie an die Anhäufung und das Concentrirterwerden der Stoffwechselproducte. Durch das Abheben der Keime vom Nährsubstrat und bei dem weiter gebotenen Schutz vor Vertrocknung kommen zunächst keine verändernden Momente in Betracht. Wie auf der Agarcultur nach ca. 20^h schon die Wachsthumscurve steil abfällt, so dürfen wir uns nicht wundern, dass in der abgehobenen Keimmasse erst recht eine explosive Vernichtung eintritt, die im Gegensatz zu dem auf dem Nährboden erfolgenden Zugrundegehen eine vollständige ist. Die Agarsubstanz bietet trotz der vorangegangenen starken Inanspruchnahme noch Nährmaterial in reichlicher Menge. Man kann sich davon überzeugen, wenn man z. B. mit einer nichtverflüssigenden Keimart Gelatineplatten giesst, auf welchen nur etwa 50 Colonieen zur Entwicklung kommen. Nach bestimmter Zeit werden diese Colonieen nicht weiter wachsen, obwohl noch grosse Mengen unangetasteter Gelatine zur Verfügung stehen. Es bilden sich concentrisch um die einzelnen Colonieen herum Diffusionszonen, innerhalb deren die specifische Art nicht weiter gedeihen kann: ein Wachstum erfolgt nur so lange, als bis die Diffusionszonen sich bis zu einem gewissen Grade nähern oder ineinandergreifen. Fertigt man ferner Agarplattenstriche z. B. mit Cholera an, so dass auf jeder Agarfläche in der Mitte ein Culturstreifen entstand, so merkt man, dass nach einigen Tagen der Belag nicht weiter in die Breite wächst. Impft man nun mit frischem Material Striche senkrecht zu der gewachsenen mehrtägigen Cultur und zwar vom vorhandenen Culturstrich beginnend nach auswärts, so ist bald zu beobachten, dass der senkrecht angelegte Strich in Keulenform wächst mit dem sich zuspitzenden Ende nach dem alten Strich zugewendet. Das Wachstum unterblieb auch sehr nahe am älteren Strich nicht vollständig, zum Zeichen, dass wohl noch Nährmaterial vorhanden war; mit der Entfernung von dem alten Culturbelag, mit dem Herausrücken aus dem Diffusionsbereiche der Zersetzungsstoffe verbreitert sich die neu gewachsene Culturmasse.

Schon auf Grund dieser Beobachtungen möchte ich nicht nur die Erschöpfung des Nährbodens, sondern in ähnlichem Maasse auch die mit gesteigertem Stoffwechsel zur Zeit reichlicher Nahrung sich bildenden Producte in Erwägung ziehen.

Mit dem Alter der Cultur nimmt nun die Keimzahl erheblich ab: am 3. Tag enthielt eine Agarflächencultur von Cholera nach den Untersuchungen von Gotschlich und Weigang im Mittel nur noch 2.76 Procent, in einer anderen Versuchsreihe sogar nur 0.8 Procent der Keimzahl der 20stündigen Cultur. Die überlebenden Keime wirthschaften also nicht in der vorangegangenen Weise weiter, der Vermehrungsthätigkeit sind die

angedeuteten Schranken gesetzt. In der Cubikeinheit finden sich jetzt relativ nur wenige Keime, die Concurrenz ist gering und wenn die Zelle mit dem immerhin noch beträchtlichen Nährmaterial, das vielleicht durch den Zerfall tochter Zelleiber noch eine Vermehrung erfährt, öconomisch umgeht, ist ihr eine längere Lebensdauer oder Vermehrung ermöglicht. Dieser Uebergang in die neue Gleichgewichtslage geschieht aber nicht plötzlich, jede Gewöhnung braucht Zeit: die Keimmasse der 48^h alten Cultur (Vers. 38, 39) giebt daher in die feuchte Kammer gebracht zwar einen Ausschlag, aber er ist nicht erheblich und nicht so constant wie bei noch älteren Vegetationen: erst diese beherbergen Keime, welche an den Nahrungsmangel gewöhnt und in bedeutendem Grade gegen ihre eigenen Producte und gegen die ihrer lebenden und tochten Vegetationsgenossen immunisirt sind. Denn eine Immunität gegenüber den eigenen Giften ist es doch, die uns die auffallende Thatsache erklärt, dass einerseits die jungen Keime der Schädigung rasch unterlagen, die Keime älterer Culturen andererseits, vor Trocknung geschützt und des Nährsubstrates beraubt, zum mindesten 52 Tage bei 37° entwicklungsfähig blieben. Es ist doch vielmehr ein acutes Vergiftungsphänomen und nicht nur das Bild eines Hungerzustandes, dass die 20^h alte Agarröhrencultur bietet, wenn, wie Gotschlich und Weigang einmal nachwiesen, in derselben binnen 4^h die Individuenzahl um 10000 Millionen abnahm. Erst die Keime, die dieses Stadium überdauern, sind für die weitere Giftgewöhnung befähigt. Wodurch diese Stoffwechsel- oder Culturimmunität erreicht wird, lässt sich bei der unzureichenden Kenntniss der Plasmasubstanz nicht beweisen. Es wird auch hier eine Summe von ineinandergreifenden Momenten der Zelle der älteren Cultur zu dieser Fähigkeit verhelfen.

Die Frage der entscheidenden Rolle, welche das Nährmaterial für die Haltbarkeit der Keime in der feuchten Kammer spielt, wurde durch weitere, oben mitgetheilte Versuche beleuchtet. Wenn den von jungen und alten Culturen abgehobenen Keimen sofort nach Uebertragen in ein Uhrschälchen und in die feuchte Kammer ein Tröpfchen Bouillon zugegeben wurde, so musste auf's Neue eine Keimvermehrung eintreten, da nun Nährstoffe wieder geboten und die Stoffwechselproducte verdünnt wurden. Auch hier ist der Lebensthätigkeit der von der jungen Cultur entnommenen Keime viel eher ein Ziel gesetzt (Vers. 80), das Nährmaterial wird von den jungen, sich schnell theilenden Zellen rasch consumirt, und wieder wird dann die hungernde Zelle sich der plötzlich und reichlich entstandenen Ausscheidungsproducte nicht erwehren können. Die von den älteren Culturen als Aussaat benutzten Keime hingegen scheinen auch auf ihre Nachkommen die Fähigkeit, dem concentrirten Medium Stand

zu halten, übertragen zu können, es waren noch nach 70 Mal so langer Zeit in den mit dem Bouillontropfen versehenen älteren Culturmassen lebende Individuen anzutreffen. Selbstverständlich würde das Resultat ganz anders ausgefallen sein, hätten wir mehr Bouillon hinzugefügt. Dann würde, wie wir es ja an unseren Bouillonröhrchen immer beobachten, auch bei den mit junger Aussaat beschickten Uhrschildchen mit der Zeit Culturimmunität eingetreten sein. Auf jeden Fall aber lehrt unsere Betrachtung, dass Cultur und Cultur, selbst wenn sie gleichen Alters sind, nicht dasselbe ist, sondern dass wir unter Umständen weiter zurückgreifen müssen, wollen wir für bestimmte Fälle vergleichbares Material haben.

Einen weiteren Beitrag für den Einfluss von Nährmaterial auf die Widerstandsfähigkeit in unserem Sinne bieten die unter Vers. 79 zusammengefassten Untersuchungen, in denen Keime von dünnster und von dicker Agarschicht der feuchten Kammer übergeben wurden. In beiden Beobachtungsreihen führen die Curven der Haltbarkeit, welche die Keime der beiden Platten mit zunehmendem Alter erfahren, zu demselben Ziele, d. h. die der alten Cultur entstammenden Mikroben erhalten ihr Entwicklungsvermögen bei Schutz vor Trocknung gleich lange Zeit, gleichviel ob sie auf dünner oder dicker Schicht gewachsen waren. Die Keime der 1 Tag alten Culturen sind ebenfalls von annähernd derselben Lebensdauer: in dieser kurzen Zeit konnte ja ein schädlicher Einfluss der dünnen Schicht noch nicht zur Geltung kommen, wie ja auch Gotschlich und Weigang bei Prüfung des Verhaltens von Cholerakeimen auf Agarflächen bei jungen Culturen keinen Unterschied der Keimzahl im dünnen oberen oder dicken unteren Theil des schräg erstarrten Agars finden konnten. In der Folge aber gestaltet sich der Anstieg der Culturwiderstandsfähigkeit verschieden: auf der dünnen Agarschicht bleibt die Keimfähigkeit in der feuchten Kammer zunächst nur kurze Zeit erhalten, sie steigt ganz allmählich an, um dann schliesslich derjenigen der auf der dicken Schicht vegetirten Keime nahe zu kommen, die ihrerseits schon in den ersten Tagen energisch zu beträchtlicher Höhe sich erhoben hatte. Die Bakterien der letzteren Cultur erreichen sehr bald schon diesen höheren Grad der Haltbarkeit in Folge eines glücklichen Zusammenwirkens einer reichen Kostmenge und der Möglichkeit, dass die Stoffwechselproducte durch Diffusion weit forttransportirt werden können. In der mageren Schicht jedoch führen die Individuen zunächst einen harten Kampf, die Schädigungen überwiegen für's Erste zu sehr, als dass die Gegenreaction einen grösseren Effect erzielen könnte. Nur nach den Seiten hin und wenig in die Tiefe sind die Zersetzungsstoffe hinwegzuschaffen, der Boden ist übersättigt und die kümmerlich ernährten Zellen, die in der That in

dieser Zeit nur geringe Resistenz offenbaren, würden der Vernichtung anheimfallen, wenn sie nicht im Laufe der Zeit durch zweckmässige Veränderungen einen den neuen Verhältnissen entsprechenden Gleichgewichtszustand erreichen würden, an welchem sie, wie wir sehen, schliesslich ebenso zäh festhalten, wie die unter weitaus günstigeren Ernährungsverhältnissen gewachsenen Keime der dicken Schicht.

Einige Beobachtungen antagonistischer und mutualistischer Art sollen hier noch angefügt werden. Bei dem häufigen Eröffnen der feuchten Kammern war es unvermeidlich, dass sich Luftkeime auf einigen Bakterienhäufchen deponirten. Die so inficirten Deckgläschen wurden selbstverständlich aus den Versuchen ausgeschaltet, gleichwohl aber weiter beobachtet. Da liessen sich beispielsweise Keime finden, welche die 5^{ms} Cholera-bakterienmasse binnen Kurzem zu einem ebenso grossen Häufchen von Keimen der eigenen Art verarbeiteten, jede Spur von Cholera-vibrionen vernichtend, andererseits gab es eine Keimart, die in friedlichem Nebeneinander 42 Tage lang mit den Cholera-keimen zusammenlebte, ohne dass die eine Art die Oberhand gewann. Ein anderes Deckglas bot die Beobachtung dar, dass es 2 Mal durch verschiedene Luftkokken verunreinigt war; als dann später wieder untersucht wurde, waren Cholera-bacillen in Reincultur vorhanden. Auffallend war es auch, dass die verunreinigenden Keime viel mehr die bei 0 und 11° gehaltene Cholera-bacillenmasse vor der bei höheren Temperaturen gehaltenen bevorzugten.

Ich schliesse hiermit die Betrachtung über das Verhalten der von Agarculturen abgehobenen Cholera-keime in der feuchten Kammer. Es ist klar, dass diese Methode noch eine Reihe weiterer biologischer Beobachtungen an den in verschiedenen Wachstumsphasen befindlichen Keimen unter Variiren der Verhältnisse ermöglichen würde. Die Anpassung an die Stoffwechselproducte der eigenen Art können schon deshalb auf diese Weise so sicher verfolgt werden, weil dieselben dabei an Ort und Stelle liegen bleiben, weil die Trocknung verhütet und die weitere complicirende Einwirkung des Nährbodens abgeschnitten ist. Zugleich aber ist diese Handhabung der Keimtödtung, wie sie z. B. bei 20ⁿ alter Cholera-cultur rasch eintritt, so gelinde wie nur möglich, so dass ohne die unberechenbaren Stoffumwälzungen herbeiführende Anwendung von Hitze und chemischen Mitteln die todte Plasmasubstanz und die ausgeschiedenen Stoffe unverändert zur Verfügung stehen.

C. Versuche über die Widerstandsfähigkeit von Keimen beim Erwärmen.

Die oben mitgetheilten Ergebnisse über die den Keimen älterer Choleraculturen innewohnende erhebliche Haltbarkeit in der feuchten Kammer legten den Gedanken nahe, dass es sich hier um eine Dauerformbildung handeln könnte, die ja bei Cholerabacillen oft genug vermuthet worden ist. Dabei mussten vor Allem die älteren Culturen berücksichtigt werden. Schon bei den Antrocknungsversuchen konnte festgestellt werden, dass sich die Keime der älteren Culturen keineswegs durch höhere Resistenz auszeichneten. Es wurden nun nochmals Versuche in dieser Richtung angestellt, wobei gleichzeitig von denselben Platten Culturmassen in die feuchte Kammer und auf's Deckglas behufs Trocknung zur Aussaat gelangten, immer zeigten sich die Keime der älteren Vegetation von der früher festgestellten grossen Labilität.

Gleichzeitig wurden Erwärmungsversuche in Angriff genommen, um zu prüfen, ob die Keime der älteren Culturen dabei eine höhere Tenacität documentiren würden. Hier stellten sich erhebliche Schwierigkeiten zur Erzielung gleichmässiger Resultate auch bei ein und derselben Cultur in den Weg. So fanden sich die einer 24stündigen Choleracultur entnommenen Keime bei Erwärmung auf 45° C. in 12 Versuchen von einer Lebensdauer, die im einen Falle schon nach 7', im extremen nach 60' noch nicht erloschen war. Dabei war schon eine Reihe von Fehlerquellen, die sich, wie aus den Arbeiten verschiedener Autoren ersichtlich war, bei Erwärmungsversuchen leicht einstellen, in Berücksichtigung gezogen worden. So wurde das mit den Keimen zu impfende flüssige Medium auf die Versuchstemperatur vorgewärmt und dann erst die Inficirung vorgenommen, damit die ungleiche Periode des Steigens der Temperatur bis zum gewünschten Grade nicht Differenzen bedingen sollte. Die Aufschwemmungsflüssigkeit befand sich dabei in Reagensröhren, diese standen in kleinem Drahtgestell, das in einen mit Wasser gefüllten Blechtopf eingesenkt wurde. Dieser Topf wiederum befand sich innerhalb eines zweiten Blechgefässes, das selbst wieder ein Wasserbad darstellte. Mit Hülfe dieses doppelten Wasserbades und eines in das erstere eingebrachten Thermoregulators war es möglich, eine ganz constante Temperatur des inficirten Mediums zu erhalten, wie die Beobachtung eines Thermometers zeigte, welches in ein mit Wattestopfen versehenes Reagensglas mit der gleichen Menge nicht inficirter Flüssigkeit eintauchte. Zur Unterstützung dieser Constanterhaltung wurde das äussere Wasserbad durch Rühren mit einer Gänsefeder, das innere durch leichtes Heben und Senken des die

Gläsern tragenden Gestelles in Bewegung gesetzt. Trotz dieser Vorsichtsmassregeln dauerten die Resultatschwankungen fort.

Ueber die Vorsicht, die man bei Erwärmungsversuchen walten lassen muss, wenn man vergleichbare Werthe erhalten will, machen Forster und van Geuns¹ äusserst zutreffende Bemerkungen. So macht Forster² darauf aufmerksam, dass z. B. in den Versuchen von Kitasato, der ein verschiedenes Verhalten der Cholerabacillen gegen Temperaturen von 50° oder 60° im Anfange nicht nachweisen konnte, Differenzen in einigen Fällen dadurch herbeigeführt sein konnten, dass derselbe bei nicht ganz gleichmässiger Vertheilung der in flüssiger Gelatine suspendirten Agar- oder Kartoffelculturtheilchen möglicher Weise mit Bakterienklümpchen gearbeitet haben wird und diese die Temperatur des umgebenden Wasserbades in ungleicher Weise annehmen mussten. van Geuns erklärt öfters erhaltene Schwankungen unter Anderen dadurch, dass nach Einführen des Platindrahtes in die erwärmte inficirte Flüssigkeit durch stärkere Bewegung desselben leicht Keime verspritzt werden und an die oberen, nicht so warmen Röhrchentheilchen gelangen konnten, wo sie lebensfähig bleiben und dann gelegentlich wieder in das erwärmte Medium zurück oder bei weiterer Entnahme von Proben mit dieser übertragen und das Resultat trüben konnten. Um dies Anstossen an die kühlere Wandung des schmalen Reagensröhrchens zu vermeiden, benutzte ich weite Reagensgläser von 2·5 cm Durchmesser zur Aufnahme der zu erwärmenden Bakterienaufschwemmung. Die Entnahme der Proben erfolgte durch zwei an langem Platindraht durch Aufrollen hergestellte Spiralen, die annähernd eine Flüssigkeitsmenge von 0·055 ccm fassten. Es wurden zwei Spiralen benutzt, um bei vergleichenden Versuchen eine gleichzeitige Prüfung zweier Proben vornehmen zu können. Die Spiralen eigneten sich auch dazu, vor der Entnahme die erwärmte Flüssigkeit leicht umzurühren.

Im Folgenden sollen zunächst Versuche wiedergegeben werden, die den Einfluss der Dichte der zu erwärmenden Bakteriensuspension in Verbindung mit der Beschaffenheit der Aufschwemmungsflüssigkeit demonstrieren. Es erschien nöthig, diese Vorfragen zu beantworten, ehe weitere Untersuchungen in Angriff zu nehmen waren.

1. Einfluss der Dichte der Aufschwemmung.

Von einer 8 Tage bei 37° gehaltenen Agarplatte von Cholera wurden in Tropfglas mit 25 Tropfen (= 1·75 ccm) steriler 0·6procent. Kochsalz-

¹ van Geuns, Ueber das Pasteurisiren von Bakterien. Ein Beitrag zur Biologie der Mikroorganismen. *Archiv für Hygiene*. 1889. Bd. IX. S. 369.

² Forster, Nachschrift zu vorstehender Arbeit. *Ebenda*. Bd. IX. S. 403.

lösung 10 Oesen Cultur (avirulent) aufgeschwemmt und durchgeschüttelt. In zwei Reagensgläsern waren inzwischen in dem einen („a“) 2^{cem}, in dem anderen („b“) 1·5^{cem} Kochsalzlösung vorgewärmt worden. Von der Choleraaufschwemmung wurden nun in a 5 Tropfen (= 0·35^{cem}), in b 15 Tropfen (= 1·05^{cem}) gegeben, so dass in a (= „verdünnt“) 17·5 Procent, in b (= „concentrirt“) 70 Procent der ursprünglichen Suspension enthalten war. Die Temperatur wurde auf 45° C. constant erhalten. Entnahme mittels Spirale und Ueberführen in Peptonwasser.

			verdünnt	concentrirt
Vers. 81:	Proben nach	5'	+	+
	„	10'	0	+
	„	15'	0	+
	„	20'	0	+
	„	30'	0	+
	„	45'	0	+

Um der Differenz vorzubeugen, die durch die ungleich schnelle Erwärmung der zur vorgewärmten Entnahmeflüssigkeit gegebenen ungleich grossen Mengen der ursprünglichen Aufschwemmung entstehen konnte, wurde auch diese Keimsuspension in vorgewärmtem, 25 Tropfen enthaltenden Tropfglase vorgenommen und einem Abkühlen während des Durchschüttelns durch Halten im 45° warmem Wasserbade begegnet. Der Versuch, bei welchem dieselben Mengenverhältnisse wie in Vers. 81 zur Anwendung kamen, ergab Folgendes:

			verdünnt	concentrirt
Vers. 82:	Proben nach	6'	0	+
	„	12'	0	+
	„	20'	0	+
	„	30'	0	+
	„	45'	0	+

Dieselben Versuche wurden mit geringem Wechsel der Dichte der Keimaufschwemmungen wiederholt und besonders auch darauf Rücksicht genommen, dass aus der verdünnteren Bakteriensuspension grössere Mengen, nämlich drei bis fünf Spiralen, auf einmal zur Aussaat in die Peptonröhrchen gegeben wurden, immer war in dieser Verdünnung allenfalls nach 5' noch ein positives Resultat zu beobachten, nach 6 oder 10' hingegen war die Keimfähigkeit erloschen. In der dichten Aufschwemmung war jedoch sogar bis 1^h 35' bei 45° bei Benutzung einer neuntägigen Ausgangscultur ausgesprochene Entwicklungsfähigkeit vorhanden. Dasselbe Verhalten zeigten die von 1 Tag alten Agarplatten zum Erwärmen gebrachten Keime.

Vers. 83. In 20 Tropfen (1.45^{ccm}) auf 45.5° vorgewärmter 0.6 procent. Kochsalzlösung wurden 15 Oesen Cultur vertheilt. Von der Suspension erhielten die 20 Tropfen Kochsalzlösung enthaltenden, vorgewärmten Reagensgläser im Wasserbad bei 45.5 bis 46° C. drei Tropfen (= „verdünnt“) und zwölf Tropfen (= „concentrirt“). Das Resultat war, dass in der Verdünnung schon nach 15', in der concentrirten Aufschwemmung erst nach $1^h 40'$ lebensfähige Keime nicht mehr angetroffen wurden.

Worin dieser destruirende Einfluss der erwärmten keimärmeren Lösung in einfacher Weise eine Erklärung findet, wird weiter unten erörtert werden. Hier genügt es, noch darauf hinzuweisen, dass man durch Variiren der Concentration nach oben und unten alle Uebergänge von grösserer zu geringerer Haltbarkeit von Cholerakeimen beim Erwärmen hätte constatiren können. In gleichem Maasse werden denn auch in der Hand verschiedener Autoren, die die gleiche und ähnliche Methode verwendeten, je nach Zugabe grösserer oder kleinerer Keimmengen die Resultate verschiedenen Ausgang genommen haben.

2. Einfluss des Aufschwemmungsmediums.

Der allgemein gültige Satz, dass ein lebendes Wesen eine Schädigung um so leichter erträgt und überwindet, je günstiger für dasselbe zur Zeit der Wirksamkeit der Insulte die allgemeinen Lebensbedingungen sind, hat sich in der Bakteriologie nur allmählich Bahn gebrochen. Wenn man z. B. frühere Desinfectionsversuche durchmustert, so wird man oft genug dieses einfache biologische Gesetz vernachlässigt sehen. Aber es konnte der Aufmerksamkeit der Beobachter nicht entgehen, dass es etwas Anderes ist, ob man ein Desinfectionsmittel auf die Mikroorganismen in Wasser oder in Bouillon und eiweissreichen Flüssigkeiten einwirken lässt. Für die Erwärmungsversuche ist in vielen früheren Arbeiten auf die Beschaffenheit des Mediums, in welchem die Keime der Wärmewirkung ausgesetzt werden, ebenfalls keine Rücksicht genommen worden.

In Vers. 83 wurde nebenbei gleichzeitig das Verhalten von Cholerakeimen in Kochsalzlösung im Vergleich zu dem der in Bouillon suspendirten beim Erwärmen geprüft. Es wurde neben der Aufschwemmung von 10 Oesen Cultur in Kochsalzlösung eine zweite Aufschwemmung der gleichen Anzahl Oesen in derselben Menge Bouillon hergestellt. Ebenso wurden im Wasserbad Röhrchen mit derselben Bouillonquantität, wie die daneben befindlichen Kochsalzgläschen, vorgewärmt und dann mit der gleichen Tropfenanzahl der Bouillonsuspension versehen, wie sie die Nachbargläschen mit der Kochsalzaufschwemmung erhielten.

Versuch 84.

Proben nach		Verdünnte		Concentrirte Keimsuspension	
		Kochsalz	Bouillon	Kochsalz	Bouillon
	8'	+	+	+	+
"	15'	0	+	+	+
"	20'	0	+	+	+
"	30'	0	+	+	+
"	40'	0	+	+	+
"	60'	0	+	+	+
"	1 ^h 20'	0	+	+	+
"	1 ^h 40'	0	+	0	+
"	2 ^h	0	0	0	0

Controlversuch.

Proben nach	8'	+	+	+	+
"	15'	+	+	+	+
"	20'	0	+	+	+
"	40'	0	+	+	+
"	60'	0	+	+	+
"	1 ^h 20'	0	+	+	+
"	1 ^h 40'	0	+	0	+
"	2 ^h	0	0	0	0

Mit aller Deutlichkeit bestätigen diese Ergebnisse den oben angeführten Satz, sie sprechen die Forderung aus, auch bei der Prüfung der Widerstandsfähigkeit einer Keimart gegen Erhitzen diesem Einfluss des Mediums, in welchem die Bakterien sich befinden, volle Beachtung zu schenken. Mit dem Festlegen dieser Thatsachen, der Bedeutung der Beschaffenheit der aufschwemmenden Flüssigkeit, sowie der Dichte der Besäung derselben, scheint die Wirkung der Temperatur in einen eigenthümlichen Parallelismus zu derjenigen der Desinfectionsmittel gerückt, die ja auch auf keimärmere, wässrige Suspension intensiver wirken als auf eine stark keimhaltige und eiweissreiche. Ein Versuch zur Erklärung dieses gleichen Endeffectes zweier so grundverschiedener Actionen soll später folgen. Uns liegt jetzt nur daran, darauf hinzuweisen, dass ebenso wie bei Desinfectionsversuchen auch hier in diesen beiden Momenten die recht häufige Differenz der Ergebnisse zahlreicher früherer Beobachtungen über die Haltbarkeit beim Erwärmen ihren Grund haben dürfte.

Unter Beachtung der gewonnenen Erfahrungen wurde nun erst die Frage geprüft, ob die Keime der älteren Choleraeultur dem Erwärmen einen grösseren Widerstand entgegensetzen würden. Die Ergebnisse zahl-

reicher Versuche, deren eintöniges Protocoll nicht wiedergegeben werden mag, verneinen diese Frage. In einzelnen Fällen besaßen jüngeren und älteren Culturen entnommene Keime eine gleiche Resistenz beim Erwärmen, in der überwiegenden Mehrzahl war eine etwas längere Lebensdauer der jüngeren Vegetation zu constatiren. Auch das Verhalten der in die feuchte Kammer gegebenen Cholerakeime älterer Culturen beim Erwärmen wurde untersucht und in Vergleich gebracht mit solchen, die direct von der älteren Platte abgehoben und erwärmt wurden. So waren bei einer Einwirkung einer Temperatur von 46° die von der 12 Tage alten Cultur abgehobenen und in Bouillon vertheilten Mikroorganismen nach 35' noch lebensfähig, während die der ebenso alten Platte entnommenen und 14 Tage lang in der feuchten Kammer belassenen schon nach 20' vernichtet waren.

Bei einer Prüfung, wie sich virulente und avirulente Cholerakeime gegen Erwärmen verhalten würden, war zu constatiren, dass in der oben „concentrirt“ genannten Bouillonaufschwemmung die virulenten 20^h alten Culturen entlehnten Keime 2^h, die avirulenten 1^h 40' der Schädigung der Temperatur von 46° widerstanden. Auch bei früheren Versuchen, in denen noch die Aufschwemmung mit Kochsalzlösung gehandhabt worden war, erwies sich die Resistenz der virulenten Cultur in demselben Sinne als grösser.

Dass in gleicher Weise wie für Cholera-vibrionen bei Suspension der Keime in Kochsalzlösung die Quantität der aufgeschwemmten Cultur für die Erwärmung von Typhus-, Diphtherie-, Pestbacillen und von *Staphylococcus pyogenes aureus* ausschlaggebend für das Endresultat ist, wurde ebenfalls durch Versuche erhärtet, die auszugsweise hier angeführt werden sollen. Dieselben Untersuchungen dienten zugleich der Beantwortung der Frage, ob bei diesen Keimen auf den älteren Culturen hitzebeständigere Individuen als auf den jüngeren sich finden lassen würden.

Aufschwemmung: Fünfzehn Oesen Cultur (bei Typhus und *Staphylococcus neutraler*, bei Pest Glycerin-Agar, bei Diphtherie Löffler'sches Serum) in vorgewärmter 0.6 procentiger Kochsalzlösung (1.5^{cem}) davon 0.21^{cem} in 2^{cem} vorgewärmter Kochsalzlösung (= „verdünnte“) und 1.05^{cem} in 1.5^{cem} Kochsalzlösung (= „concentrirte Aufschwemmung“). Die Prüfung der entnommenen Proben auf Keimfähigkeit geschah in der bei den Austrocknungsversuchen gehandhabten Weise.

Die Resultatschwankungen bei verschiedener Keimaussaat unter Benutzung der Kochsalzlösung als Aufschwemmungsflüssigkeit treten auch hier deutlich hervor. Auch ist eine grössere Haltbarkeit der den älteren Culturen entstammenden Keime nirgends zu erkennen.

Tabelle IX.

Keimart	Alter der Cultur in Tagen	Erwärmungs- grad Grad C.	Concentrirte Aufschwemmung		Verdünnte Aufschwemmung	
			+	0	+	0
Typhus	1	52	2 ^h —'	2 ^h 30'	— ^h 50'	1 ^h —'
„	7	52	1 30	1 45	— 40	— 50
Diphtherie	1	51	4 ^h —'	—	—	—
„	1	51	4 50	—	1 ^h 30'	1 ^h 45'
„	10	51	2 30	3 ^h —'	—	—
„	14	51	2 —	2 30	— ^h 50	1 —
Pest	1	50	1 ^h 45'	—	— ^h 10'	— 20'
„	5	50	— 50	1 ^h —'	—	—
„	18	50	— 20	— 30	—	—
Staphylococc.	1	53	2 ^h 50'	—	—	—
pyog. aureus	1	52	4 —	—	2 ^h 15'	2 ^h 30'
	9	53	2 —	2 ^h 20'	—	—

Nachdem so die Austrocknungs- und Erhitzungsversuche mit den auf älteren Vegetationen befindlichen Keimen ebenso wie anderen Beobachtern, die dieselbe Frage in anderem Zusammenhange untersuchten, bewiesen haben, dass eine gesteigerte Resistenz gegenüber den genannten Einflüssen nicht wahrnehmbar ist, wurde noch auf andere Weise versucht, die etwaige Tenacität festzustellen, nämlich durch Ueberführen in Wasser. Da diese Versuche das Ausgangsmaterial für weitere Fragen bildeten, sollen sie erst im nächsten Abschnitte mitgetheilt werden. Hier sei vorausgeschickt, dass auch im Wasser die Keime der älteren Nährsubstrate die Widerstandsfähigkeit derjenigen der jüngeren Cultur keinesfalls überragten. Um eine Dauerform der Cholerabacillen, die, wie wir sahen, vom Nährsubstrat losgelöst in der feuchten Kammer eine mit dem Alter der Cultur sich steigernde Lebensfähigkeit bewahrten, kann es sich also auf den älteren Culturen nicht handeln, wenigstens nicht um eine Sporenbildung, die ja nach den üblichen Forderungen den Nachweis erhöhter Resistenz gegen Trocknen und Siedehitze zur Bedingung macht. Einer solchen Sporenbildung, die für eine Reihe pathogener Mikroorganismen neuerdings namentlich von botanischer Seite geradezu gefordert und als sicher vorhanden angenommen wird, bedarf es aber gar nicht einmal zur Erklärung verschiedener epidemiologischer Thatsachen, wenn wir uns der Erkenntniss nicht verschliessen, dass auch die vegetative Form eines Keimes unter Umständen sich in hohem Maasse an schädigende Insulte gewöhnen kann und so die Art zu erhalten aufgerüstet und bestrebt ist.

D. Verhalten von Cholerakeimen in Wasser und einfachsten wässerigen Lösungen.

Bei der grossen Verbreitung und Bedeutung des Wassers in der Natur, sowie bei der reichlichen Verwendung, die dasselbe im menschlichen Haushalte findet, wird es immer von hohem Interesse erscheinen, das Verhalten von Krankheitserregern im Wasser zum Gegenstand der Untersuchung zu machen und nach verschiedenen Richtungen hin zu beleuchten. So werden wir nicht nur darnach fragen müssen, unter welchen Bedingungen sich im Wasser die pathogenen Mikroorganismen vermehren werden, sondern es wird gleichermassen der Erörterung werth sein müssen, ob sich dieselben im Wasser zu conserviren vermögen, um dann im geeigneten Moment, in günstige Bedingungen gebracht, ihre verderbliche Wirkung zu entfalten, oder endlich wir werden unser Augenmerk darauf zu richten haben, unter welchen Umständen ein Wasser die Keime zum Absterben bringt.

In den folgenden Versuchen wurde ausschliesslich mit Cholera-vibrien gearbeitet, vor Allem deshalb, weil dieselben als äusserst empfindliche Keime Schädigung oder Begünstigung rasch anzeigen und daher die gefundenen Werthe immer bald durch Controlversuche sicher gestellt oder durch weitere Fragestellung einer möglichst eindeutigen Erklärung entgegengeführt werden konnten. Ausserdem ist ja gerade über das Verhalten der Erreger der Cholera im Wasser bei dem hohen praktischen Interesse, das diese Frage bietet, eine solche umfangreiche Litteratur zusammengekommen, dass schon bei einer vergleichenden Betrachtung dieser Publicationen eine Reihe von Versuchsfehlerquellen und Differenzen hervortraten, die weiter zu verfolgen von Interesse schien.

Bevor die Mittheilung von Untersuchungen erfolgen soll, erscheint es nothwendig, auf eine Reihe von Momenten näher einzugehen, die für den Ausfall der Versuche von Bedeutung sein mussten.

Ueber quantitative Keimbestimmung.

In einer früheren, unter Prof. Hofmann's Leitung entstandenen, Arbeit¹ habe ich ausführlicher über Fehlerquellen bei quantitativen Keimbestimmungen unter experimenteller Begründung berichtet. Dasselbst ist auch die auf Veranlassung von Prof. Hofmann verwendete Methode der Feststellung von Keimmengen mittels Tropfgläser eingehend besprochen

¹ Ueber Wachsthumsgeschwindigkeit des *Bacterium coli commune* auf Platten. *Dissertation.* Leipzig 1893.

und die hohe Exactheit derselben durch zahlreiche Vergleiche mit anderen Verfahren erwiesen worden. Dieselbe hat sich auf's Neue bei allen folgenden Versuchen bewährt, ohne dieselbe hätten diese bei der zur Nothwendigkeit gewordenen Häufigkeit der Probeentnahme kaum ausgeführt werden können. Die übliche Abmessung mittels Pipetten konnte schon deshalb für die Mehrzahl der Versuche nicht in Frage kommen, weil bei jeder erneuten Prüfung des zu untersuchenden keimhaltigen Wassers das Lüften eines Verschlusses veranlasst worden und damit die nicht zu vermeidende Möglichkeit einer Luftinfection gegeben gewesen wäre. — Die Tropfgläser, von denen für die vorliegenden Versuche etwa achtzig zur Verwendung kamen, sind signirt, die Tropfenconstanten tabellarisch zusammengestellt, was im Verein mit den für das Plattenmikroskop berechneten Constanten wesentlich zur Erleichterung der zahlreichen Berechnungen beitrug.

Vorbemerkungen über Glas und oligodynamische Wirksamkeit.

Der Einfluss, den die Wandung von Glasgefässen auf keimhaltige Medien ausüben könnte, ist in der Bakteriologie wenig oder gar nicht untersucht oder berücksichtigt worden.

In der Chemie ist es schon Lavoisier gewesen, der das Auflösen kleiner Mengen der Gefässsubstanz bei Kochen von Wasser in Glas und Porzellan constatirte. Aber erst in der neueren Zeit haben genauere quantitative und qualitative Untersuchungen darüber stattgefunden, die in ihren Einzelheiten noch nicht abgeschlossen, doch schon mit aller Schärfe zum Ausdruck bringen, dass alle feineren Messungen der analytischen Chemie diese Glaswirkung keinesfalls vernachlässigen dürfen.

Berücksichtigen wir zunächst nur einmal die Alkalimengen, die ein Glasgefäss dem in demselben befindlichen Wasser mitzuthellen vermag, so finden wir darüber exacte Feststellungen in den Arbeiten von Mylius und Foerster,¹ die im Auftrage der Physikalisch-technischen Reichsanstalt die Frage der Beurtheilung von Glasgefässen zu chemischem Gebrauche in Angriff nahmen.

Die Autoren verschafften sich die allerverschiedensten Glassorten in Kolben- und Flaschenform und bestimmten mit einer besonders ausgearbeiteten Methode die Löslichkeit bezw. Angreifbarkeit des Glases in der Weise, dass sie die in Wasser während bestimmter Zeit sich lösenden

¹ Mylius und Förster, Ueber die Beurtheilung von Glasgefässen zu chemischem Gebrauche. Die Einwirkung von Wasser auf Glas. *Zeitschrift für analytische Chemie*. 1892. Bd. XXXI. S. 241. — Förster, Vergleichende Prüfung einiger Glasarten hinsichtlich ihres chemischen Verhaltens. *Ebenda*. 1894. Bd. XXXIII. S. 381.

Alkalimengen mit Hilfe von Jod-Eosin und Aether als Indicator durch Titration noch $0.1 \text{ mg Na}_2\text{O}$ in 100 cm^3 Wasser und kolorimetrisch noch kleinere Mengen feststellten. Das für die Versuche nothwendige neutrale Wasser war durch Destillation in Platingefässen gewonnen. Die Summe der in dem Wasser nach Berührung mit Glas gefundenen Mengen der alkalischen Bestandtheile (Natron, Kali, Kalk) wurde, durch die äquivalente Menge Na ausgedrückt, zu der Oberfläche des untersuchten Gefässes in Beziehung gebracht. Die ermittelten Zahlen bedeuten dann die Menge des von 100 cm^2 Oberfläche in Lösung übergegangenen Alkalis ausgedrückt in Tausendstel Milligrammen Natron. Bei verschiedenen im Handel als gut bezeichneten Sorten lieferten die Kolben beispielsweise, wenn sie 24 h lang mit Wasser von etwa 20° in Berührung waren, Alkalimengen in der Höhe von 5 bis 435. Die Angreifbarkeit sinkt dann mit der Digestionsdauer rasch: sie ist beim frisch bezogenen Glas am höchsten und wird in den folgenden Tagen bedeutend niedriger, ohne jedoch zu verschwinden. In viel stärkerem Maasse zeigt sich das Glas angreifbar bei höherer Temperatur, so schwanken die für die verschiedenen Sorten nach obigen Grundsätzen ermittelten Alkalimengen, die sich während 1 h in Wasser von 80° lösten, zwischen 18 und 1213. Bei den Versuchen mit heissem Wasser geht die Menge der in der Zeiteinheit gelösten Alkalibestandtheile nach mässig raschem Abfall in eine constante Grösse über. Diese Constanz bildet sich bei schlechteren Sorten erst spät heraus, wohl deshalb, weil durch die concentrirtere Alkalilösung Kieselsäure in Lösung kommt und damit neue Angriffspunkte zur Alkalilösung gegeben werden.

Diese Andeutungen aus den genannten Arbeiten mögen genügen, es zu rechtfertigen, wenn wir bei feineren Untersuchungen über das biologische Verhalten von Keimen z. B. in einer gegebenen Lösung, sei es, dass die Veränderung der Lösung durch den Lebensprocess der Bakterien, oder dass die Beeinflussung der vitalen Eigenschaften der Keime durch das dargebotene Medium exact verfolgt werden soll, die Veränderung der die Keime enthaltenden Flüssigkeit durch die Glaswand in Erwägung ziehen müssen. Und das um so mehr, als wir bei derartigen Versuchen alle für die Lösung der Alkalibestandtheile günstigen Bedingungen schaffen: die Keimsuspension bleibt dann nicht nur tage- und wochenlang mit der Glaswand in Contact, sondern, was an und für sich schon mit wochenlanger Berührung nach den obigen Versuchen gleichbedeutend ist, das in dem Glase befindliche Medium wird vor der Impfung zumeist 2 h lang im Dampfsterilisator Hitzegraden ausgesetzt, die nachweislich der Zersetzung des Glases in hohem Grade Vorschub leisten. Wir bekommen hierdurch sowohl wie durch das weitere Aufbewahren eine Alkalimenge, die so gering sie auch bei nur kurzer Einwirkung des Glases erscheint,

bei der Constanz des Processes durch fortwährende Summation sich zu einer beträchtlicheren Grösse steigern muss. — Um diese durch Einwirkung des Glases sich ergebenden Fehlerquellen zu vermeiden oder wenigstens herabzudrücken, habe ich bei den folgenden Versuchen theilweise des Jenaer Glases mich bedient, das nach den Untersuchungen der Physikalisch-technischen Reichsanstalt eine hochgesteigerte Widerstandsfähigkeit gegen chemische Agentien besitzt und das beste böhmische Glas in der Resistenz gegen Wasser von 20° um das 4- bis 5fache, gegen Wasser von 80° um das 11- bis 12fache übertrifft. Die Alkaliabgabe desselben an Wasser von 20° betrug während 8 Tage 3.0 (in mg/1000 Na₂O), dieser Werth stieg bei einer darauf folgenden 3^h langen Berührung mit Wasser von 80° auf 5.15. — Da wir nun in den Cholera-vibrionen Keime vor uns haben, die schon die Anwesenheit kleinster Alkalimengen mit erhöhter Leistungsfähigkeit beantworten, so schienen sie besonders dazu geeignet, uns Aufschluss zu ertheilen über die Einwirkung von Jenaer Glas einerseits und andererseits von gewöhnlichem Glase auf Wasser und wässrige Lösungen bekannter Constitution. Durch eine Reihe mitzutheilender Versuche tritt denn auch ein Unterschied hierbei deutlich zu Tage, wobei die Beobachtung werthvoll erscheint, dass unsere Keime vermöge ihrer hohen Empfindlichkeit so rasch und sicher in dieser Frage eine Antwort ertheilten, wie es auch das feinste chemische Reagens kaum besser zu thun vermöchte. — Es sei nochmals hervorgehoben, dass für eine Anzahl subtiler mikrobiologischer Fragen, für Stoffumsatzbestimmungen bei Keimen, für die Frage der Entbehrlichkeit dieses oder jenen Elementes u. s. w. man der Berücksichtigung dieser Beeinflussung sich nicht wird entziehen können, wenn man nicht, wie es vielleicht schon geschehen sein dürfte, Täuschungen anheimfallen will.

Bekanntlich ist es von Nägeli gewesen, der den Einfluss minimaler Mengen löslicher Stoffe auf lebende Zellen in eingehendster Weise verfolgte. Die Resultate dieser Untersuchungen finden wir niedergelegt in der Arbeit „Ueber oligodynamische Erscheinungen in lebenden Zellen“.¹ Sie wurde unter den nachgelassenen Papieren des berühmten Gelehrten gefunden und von S. Schwendener der Oeffentlichkeit übergeben. Durch Letzteren erfahren wir auch, dass v. Nägeli, der seit Beginn der achtziger Jahre mit dem Gegenstand sich beschäftigte, durch diese Untersuchungen zur Annahme einer neuen Kraft, der „Isagität“, geführt worden sei. Das Wort „isagisch“ hat dann v. Nägeli durch „oligodynamisch“ ersetzt. Es sei mir gestattet, bei dieser höchst interessanten

¹ *Neue Denkschriften der allgemeinen schweizerischen Gesellschaft für die gesammten Naturwissenschaften.* 1893. Bd. XXXIII. Abth. I.

Schrift v. Nägeli's, die dem Mediciner weniger bekannt sein dürfte, etwas länger zu verweilen, wobei ich weniger das pathologisch-anatomische Bild der geprüften Zellveränderung berücksichtigen, als vielmehr das hervorheben möchte, was sich, wenigstens theoretisch, ebenso gut in die Biologie der Bakterien übertragen liesse, — dass wir dazu aber für viele Fälle in der That ein Recht haben, werden die angestellten Versuche zeigen.

v. Nägeli wollte die von Löw und Bokorny aufgestellte Behauptung, dass Silbernitratlösungen durch lebendes, nicht aber durch todttes Protoplasma reducirt würden, nachprüfen. Er benutzte zu diesen Versuchen, wie die genannten Autoren, Süßwasseralgen und besonders die Spirogyren, grüne Fadenalgen. v. Nägeli fand die obigen Beobachtungen bestätigt, bemerkte aber gleichzeitig bei einer weitgehenden Verdünnung der Lösung, dass dann beim Absterben ganz andersartige Veränderungen sichtbar wurden als bei der gewöhnlichen Art des Absterbens. Die Erscheinungen der letzteren Art nahmen mit zunehmender Verdünnung ab, die andersartigen, ungewöhnlichen Veränderungen aber, die der Hauptsache nach in der Lostrennung der Spiralbänder vom Plasmaschlauche bestanden, ein Vorgang, der bei der chemisch giftigen Wirkung nie eintrat, steigerten sich dabei, sie blieben bei fortschreitender Abnahme des Giftes, selbst bis zum Verschwinden desselben, ungeschwächt. Diese Wirkungen bezeichnet v. Nägeli als oligodynamische im Gegensatz zu den specifisch chemischen Wirkungen des Giftes. Als er Sublimatverdünnungen herstellte, fand er bei 1:1000000 die chemisch-giftige Wirkung nicht mehr, es zeigte sich dann die oligodynamische, die bei einer bis auf das Septillionfache getriebenen Verdünnung noch vorhanden war. Da die Wirkung mit der Verdünnung nicht verschwand, so konnte sie nicht durch eine Kraft herbeigeführt sein, die von dem Gift auf's Wasser übergegangen war. Es konnte also nur das Wasser oder das Glas die Schuld tragen. Als er nur destillirtes Wasser prüfte, starben die Spirogyren darin in kurzer Zeit, zuweilen in weniger als 4'. Brunnenwasser verhielt sich häufig ebenso. Um zu prüfen, woher diese verderbliche Wirkung des destillirten und des im gewöhnlichen Leben als rein bezeichneten Wassers stamme, dachte v. Nägeli zunächst an chemische Ursachen. Aber weder CO_2 , NH_3 , O_3 , HNO_2 oder H_2SO_4 konnten bei näherer Prüfung als Ursache erkannt werden, vielmehr zeigte sich, dass Metalle dem Wasser oligodynamische Eigenschaften ertheilten, z. B. Kupfer, Silber, Blei, Zinn u. s. w. Vor Allem bediente er sich gut gereinigter Kupfermünzen, um Wasser oligodynamisch zu machen. Wurden dann unlösliche Körper, z. B. Graphit, Rus, Filterpapier, Baumwolle, Paraffin, Stearinsäure in das Wasser gegeben, so wurden die oligodynamischen Erscheinungen vermindert oder aufgehoben. Dieselbe Wirkung wie Filterpapier u. s. w. hatte die Zugabe neuer Algen

zellen: die Spirogyren vermochten den schädlichen oligodynamischen Wirkungen um so eher zu widerstehen, in je grösseren Quantitäten sie im Wasser vorhanden waren. Micellarlösliche Verbindungen, wie Gummi, Dextrin, Leim, besaßen ebenfalls neutralisirende Eigenschaften. Dass sich Glas sehr ungleich verhielt, erklärt v. Nägeli damit, dass die Nachwirkung eines früher mit dem Glase in Berührung gewesenen Stoffes sich geltend machen könne: legte er beispielsweise mehrere Goldkronen in ein Glas mit Wasser und nahm er dieselben nach einigen Tagen heraus, so zeigte sich, dass das Glas nach Ausgiessen des Wassers und gutem Ausspülen oligodynamische Eigenschaften angenommen hatte. Kupfer hinterlässt eine Nachwirkung, die selbst nach 3- bis 4 maliger weiterer Verwendung des Glases zu Culturzwecken noch, wenn auch schwach, vorhanden ist. Da es v. Nägeli nach all' den Erfahrungen unmöglich erschien, dass die oligodynamische Wirkung von einer gelösten Verbindung herrühren könnte, so wendete er sein Augenmerk auf imponderable Ursachen. Aber weder der Wärme noch der Lichtwirkung war die Rolle eines selbstständigen Factors beizumessen, die erstere beeinflusste nur insofern die oligodynamische Wirksamkeit, als bei Erhöhung der Temperatur und der Annäherung an das Vegetationsoptimum rascheres Abtöden eintrat. Auch die Versuche über die Elektrizität als Ursache der räthselhaften Erscheinungen führten zu negativem Resultate. In der Folgezeit war v. Nägeli der Ueberzeugung, ein neues, unbekanntes Agens müsse die Wirkung veranlassen, und er sprach sich in gleichem Sinne in einem Vortrag der Königl. Bayer. Akademie der Wissenschaften aus. Später nahm er die Untersuchungen wieder auf und fand zunächst, dass reines Gold und Platin dem Wasser keine oligodynamischen Eigenschaften ertheilten: die früheren Resultate, nach denen Platin doch oligodynamische Eigenschaften abgegeben hatte, erklärt er jetzt durch Nachwirkung von den Culturgefässen her. Diese Nachwirkung vermochte er durch Reinigen mit Salz- oder Salpetersäure oder auch durch langes Kochen der Gläser aufzuheben. Daraus entsprang die Vermuthung, dass das oligodynamisch Wirksame ein in Wasser schwer löslicher Stoff sein müsse, vielleicht Kupfer. Als v. Nägeli 10 Liter eines deutlich wirkenden destillirten Wassers chemisch untersuchte, fand er im Rückstand Blei, Zink, Kupfer und Eisen. Um Aufschluss über die zur Wirkung nothwendige Quantität von Metall zu gewinnen, beschickte er 12 Liter eines neutralen destillirten Wassers mit zwölf Zweipfennigstücken. Nach 3 bis 4 Tagen enthielten 10 Liter Wasser 0.00013^{grm} Kupfer, d. h. 1.3 Kupfer: 100 Millionen Wasser oder 1 Kupfer zu 77 Millionen Wasser. Nach alledem nimmt v. Nägeli an, dass in allen Fällen das oligodynamische Vermögen des Wassers doch auf Stoffe, die in demselben gelöst sind, zurückzuführen sei. Nur blieb hierbei das

Auftreten der Nachwirkung in den Gläsern, sowie die Aufhebung der Wirksamkeit durch unlösliche Körper räthselhaft, Umstände, die ja bei Vergleich mit Zucker- oder Salzlösungen kein Analogon besaßen. Aber die Schwerlöslichkeit des Metalles erklärt dies Verhalten. Giebt man Kupfer in Wasser, so trennen sich Kupfertheilchen los, vertheilen sich im Wasser und treffen auch an die Glaswand: mit Concentrirterwerden der Lösung nimmt die Zahl der an der Wandung haftenden Kupfertheilchen zu. Die Gesamtmenge des Kupferüberzuges aber ist um so grösser, je ausgedehnter, im Verhältniss zum Wasser, die Wandfläche. Bringen wir unlösliche Körper, wie das zur Neutralisirung des wirksamen Wassers geschah, in das letztere, so vergrössern wir die Oberfläche und vermindern dadurch die Concentration. Das Phänomen der Nachwirkung erklärt sich durch das Anhaften des Kupferbelages an der Glaswandung, der oft weder mit der Bürste noch durch mehrmaligen Gebrauch des Glases entfernt werden kann. Dieselbe Nachwirkung konnte v. Nägeli constatiren, wenn er Lösungen von Kupfer-, Silber- oder Quecksilbersalzen verwendete.

Auf Grund dieser Untersuchungen erklärt v. Nägeli die ungleichen Eigenschaften des destillirten und Brunnenwassers dadurch, dass dasselbe, wenn es neutral wirkte, nicht, hingegen wenn es oligodynamisch wirkte, immer mit Metall in Berührung gewesen war.

Schliesslich entwickelt v. Nägeli nochmals die Gründe, die ihn veranlassen, die oligodynamische Erscheinung als eine gesonderte, streng von der chemisch-giftigen Wirkung zu scheidende aufzufassen.

Die Mittheilungen v. Nägeli's, die schon deshalb von hohem Interesse sind, weil sie eine dem Auge wahrnehmbare, qualitativ vollkommen verschieden sich geltend machende Veränderung von Zellen je nach Abstufung der Concentration einer Lösung constatiren, erfordern aber, wie ich glaube, auch ganz besonders die Aufmerksamkeit des Bakteriologen. Denn um wie viel mehr wird er gerade im Stande sein, die Beeinflussung des Zelllebens durch kleinste Mengen gelöster Stoffe feststellen zu können, der, unter Benutzung bekannter Lösungen, mit einer bekannten Aussaatmenge lebender Zellen zu arbeiten und durch exacte quantitative Bestimmungen den Endeffect zu controliren vermag. Gerade die Bakterienzelle wird bei ihrem winzigen Bau in rascher, präziser Weise darüber Aufschluss geben, ob wir z. B. eine Lösung mit minimalen, kaum oder schwer nachweisbaren Spuren einer Substanz als indifferent oder schädigend für das Bakterienzellleben zu bezeichnen haben. Da uns das Verfolgen des mikroskopischen Verhaltens hier im Stich lassen dürfte, schon weil die Feststellung des Todes dabei unsicher ist, so wird die Cultur den Endausgang am besten constatiren. Damit entfernen wir uns allerdings

von den Untersuchungen v. Nägeli's, der ja gerade wegen der direct sichtbaren Veränderungen die oligodynamische Wirkung von der chemisch-giftigen glaubte trennen zu müssen. Vielmehr würde in bakteriologischem Sinne die Bezeichnung oligodynamisch für die Fälle zutreffend sein, wo nachweislich minimalste Stoffmengen die Zelle des Entwicklungsvermögens berauben.

1. Verhalten der auf jüngeren und älteren Culturen gewachsenen Cholerakeime im Wasser.

In einer Anzahl von Versuchen, in denen zunächst dichte Aufschwemmungen von Cholerakeimen jüngerer und älterer Culturen in destillirtem Wasser hergestellt wurden, ergab sich, als zur Keimzahlbestimmung eine Anzahl Tropfen aus der Keimsuspension in 25^{cem} 0.5-procent. NaCl-Lösung gegeben wurden, dass öfters die von dieser Verdünnung aus hergestellten Gelatineplatten steril oder arm an Colonieen blieben, obwohl eine reichliche Anzahl der letzteren der ungefähren Abschätzung eines Hängetropfens des Originals nach hätten erwartet werden müssen. Manchmal, wenn aus dem letzteren eine grössere Tropfenanzahl in die Verdünnungslösung gegeben wurde, gingen reichliche Colonieen auf. Besonders die Keime der älteren Culturen verhielten sich schwankend.

Nach diesen Beobachtungen wurde zunächst die Frage in Angriff genommen, wie verhält sich ein und dieselbe Keimzahl in der als Verdünnung zur Herstellung zählbarer Platten benutzten gleichen Menge von Bouillon, Peptonwasser oder 0.5 procent. NaCl-Lösung?

Vers. 85. Fünfzehn Oesen einer 8 Tage alten Cholera-cultur (Agarplattenstrich) wurden in 1^{cem} 0.5procent. NaCl-Lösung aufgeschwemmt, davon fünf Tropfen in je 25.0 Bouillon, Peptonwasser und 0.5procent. NaCl-Lösung in Tropfgläsern gegeben. Diese Verdünnungen wurden in gleichmässiger Weise gleich lange geschüttelt und darnach mit zwei Mal fünf Tropfen Platten gegossen. Schliesslich wurden von der Originalaufschwemmung direct mit je einem Tropfen Platten angelegt.

Die Keimzählung der acht Platten ergab Folgendes:

	1 Tropfen Original-	5 Tropfen der Bouillon-	der Pepton- wasser-	der Kochsalz- verdünnung
Platte α :	889 000	59 000	61 000	581
„ β :	917 000	54 800	53 500	627

Berechnen wir diese Zahlen auf die Originalaufschwemmung zurück, so würde 1^{cem} derselben enthalten nach:

1. directer Zählung	2. nach Bouillon-	3. nach Peptonwasser-	4. nach Kochsalz- verdünnung
12 600 000	11 400 000	11 500 000	124 000 Keime.

Vers. 86. Zur Nachprüfung dieser Resultate wurden fünfzehn Oesen einer 11tägigen Agarcultur in 1^{cem} 0.5procent. NaCl-Lösung und die gleiche Anzahl Oesen in 1^{cem} Bouillon vertheilt. Von jeder dieser beiden Aufschwemmungen wurden je fünf Tropfen in 25.0 Bouillon und 25.0 0.5procent. NaCl-Lösung gegeben, geschüttelt und Platten gegossen, ebenso auch vom Original je ein Tropfen direct in Gelatine vertheilt. Berechnet auf 1^{cem} Original ergaben die Zählungen:

Bouillon direct	Bouillon verdünnt	Kochsalz direct	Kochsalz verdünnt
1 ^{cem} = 9 880 000	9 450 000 (9 200 000)	8 000 000	500 000 (240 000)
	Kochsalz verdünnt 8 400 000 (7 900 000)		Bouillon verdünnt 8 000 000 (6 900 000)
(Controlzahlen in Klammern.)			

Es wurden nun auch 20^h alte Culturen als Ausgangsmaterial benutzt, sowie mit den Temperaturen variirt, um dieser Wirkung der Kochsalzverdünnung nachzugehen.

Vers. 87. Je fünfzehn Oesen 20^h alter Cultur wurden in 1^{cem} auf Eis gekühlter, sowie in ebenso viel auf 37° vorgewärmter 0.5procent. NaCl-Lösung vertheilt. Aus jeder dieser dichten Suspensionen wurden sofort fünf Tropfen in 25.0 0.5procent. NaCl-Lösung und ebenso viel Tropfen in 25.0 Bouillon gegeben. Die Aussaat wurde so bewerkstelligt, dass die Verdünnungsflüssigkeiten die gleiche Temperatur wie die Originalaufschwemmungen besaßen. Die Verdünnungen wurden gleichmässig geschüttelt und dann Platten gegossen. Derselbe Versuch wurde sodann wiederholt, nur kamen dabei in der Originalaufschwemmung vier Oesen 24^h alter Cultur zur Vertheilung. (Vers. 88.)

1 ^{cem} Original =	37°	0°
nach Bouillonverdünnung	497 000 000	525 000 000
„ Kochsalzverdünnung	26 000	14 000

Versuch 88.

nach Bouillonverdünnung	89 000 000	98 000 000
„ Kochsalzverdünnung	135 000	750 000

Zur weiteren Charakterisirung von Kochsalzlösung als Verdünnungsmaterial sei noch folgender Versuch angeführt. Es handelte sich um

Keimzahlbestimmungen einer wässrigen Aufschwemmung. Die Verdünnung des keimreichen Materiales geschah in der Weise, dass fünf Tropfen in 25^{cem} Bouillon vertheilt und hiervon Platten angelegt wurden. Neben dieser Bouillonverdünnung wurde in demselben quantitativen Verhältniss 0.7 procent. Kochsalzlösung zum Verdünnen verwendet, in gleichmässiger Weise geschüttelt und mit gleichen Tropfenmengen wie aus den Bouillongläsern Platten und Controlplatten gegossen. Die durch Plattenzählung gewonnenen Werthe wurden auf die Einheit eines Cubikcentimeters der Originalaufschwemmung zurückgerechnet, dadurch ergaben sich die in der folgenden Tabelle zusammengestellten Zahlen, wobei unter α die durch die Zählung der einen Platte, unter β die durch Zählung der Controlplatte ermittelten und auf die Einheit berechneten Werthe angeführt sind.

Derselbe Versuch ist in anderem Zusammenhange auf S. 56 mitgetheilt, woselbst auch die Versuchsanordnung vermerkt ist.

Tabelle X.
Keimbestimmung mittels

Cholera-Aufschwemmung 1 cem =	Bouillonverdünnung			Kochsalzverdünnung		
	α	β	Mittel	Mittel	α	β
1 bei Aussaat	39 000 000	37 000 000	38 000 000	401 000	490 000	312 000
nach 1 Tag	472 000	540 000	506 000	320 000	320 000	460
„ 3 Tagen	24 500 000	18 200 000	21 350 000	9 031 000	18 000 000	62 000
2 „ 1 Tag	40 900 000	37 700 000	39 300 000	298 000	437 000	159 000
„ 2 Tagen	72 500 000	68 200 000	70 350 000	35 250 000	70 200 000	1 300 000
„ 3 „	18 200 000	23 500 000	20 850 000	19 525 000	16 750 000	22 300 000
3 „ 1 Tag	1 200 000	900 000	1 050 000	423 000	846 000	130
„ 2 Tagen	56 700 000	51 000 000	53 850 000	25 100 000	50 125 000	75 000
„ 3 „	23 600 000	21 000 000	22 300 000	205 000	363 000	47 000

Aus allen diesen Erfahrungen ist mit aller Entschiedenheit die Folgerung zu ziehen, dass die sogenannte physiologische Kochsalzlösung weit davon entfernt ist, ein für die Chölerabacillen indifferentes Medium zu sein, vielmehr wirkt dieselbe unter Umständen in hohem Grade baktericid, in einem Falle z. B. derart, dass der durch die Kochsalzverdünnung ermittelte Werth fast um das 10000fache hinter dem wirklichen Keimgehalte des untersuchten Materiales zurückstand.

Im Uebrigen zeigt dieses keimtödtende Vermögen der verwendeten Salzlösung die grössten Schwankungen, in mehreren Fällen war eine Keimverminderung durch die Lösung überhaupt nicht zu constatiren.

Im Laufe späterer Untersuchungen werden einige Factoren, die für dies Verhalten von ausschlaggebender Bedeutung sind, hervorgehoben und zergliedert werden. Schon aus obigen Versuchen geht klar hervor, dass der Grad der bakterienvernichtenden Wirkung der Lösung in einigen Beispielen ganz und gar von der Menge der eingesäten Keime bzw. der Menge des mit denselben eingeführten Nährmaterials abhing. So haben wir in Vers. 86 (S. 53) gesehen, dass, als die Originalaufschwemmung mit Kochsalzlösung hergestellt ward, in der gleichnamigen zu Verdünnungszwecken benutzten Lösung über 95 Procent zu Grunde gingen, hingegen, als in diese Verdünnungslösung mit der Einsaat zugleich Bouillon (fünf Tropfen zu 25^{cem} Kochsalzlösung) gegeben wurde, die Keimzahl in nur wenig merklicher Weise beeinflusst wurde.

Diese Thatsache, dass mit dem Keimmateriel in die Kochsalzlösung übertragene Quantitäten von Nährmedium die schädigende Wirkung der Lösung entweder abzuschwächen oder aufzuheben vermag, entschuldigt es wohl auch, dass diese Schädigung bisher recht gering geachtet wurde, und die Kochsalzlösung zum Suspendiren von Keimen sich einer weitverbreiteten, allgemeinen Beliebtheit erfreut. Es ist klar, dass diese aus der thierischen Physiologie ohne Weiteres in die Bakteriologie übertragene Methode ganz ungerechtfertigt ist, da sie zu groben Fehlern führen kann. So viel sich jetzt folgern lässt, wird die durch die verschiedengradige Alteration der eingesäten Mikroben verschuldete Inconstanz der Resultate um so verhängnissvoller, je ungünstiger sich das Verhältniss der mit den Keimen übergeführten Nährsubstanz zu dem Volumen der Verdünnungslösung gestaltet.

In der Folge habe ich immer neutrale Bouillon oder eine neutrale Peptonkochsalzlösung (Pepton 0.1, Kochsalz 0.5, Aqua destillata 100.0) zur Verdünnung benutzt. Die letztere Lösung ist, wie Versuche zeigten, nicht gerade ein optimaler Nährboden, bleibt aber für einige Zeit dem Lebensprocesse unserer Vibrionen gegenüber indifferent.

Nur beiläufig sei bemerkt, dass mir die Beobachtung des raschen Zugrundegehens der Keime in der Kochsalzlösung deshalb zur unangenehmen Ueberraschung wurde, weil aus diesem Grunde die Ergebnisse einer Reihe von Versuchen als unzuverlässig ausgeschaltet werden mussten. Inwieweit dasselbe mit den in der Litteratur niedergelegten Resultaten, die in reichlicher Anzahl auf derselben und ähnlichen Versuchsanordnung fussen, zu geschehen hat, bleibe dahingestellt.

Nun erst konnte die Frage, ob die Keime jüngerer oder älterer Choleraculturen im Wasser einen Unterschied der Resistenz zeigen, untersucht werden.

Zu diesem Zwecke benutzten wir destillirtes Wasser, weil wir dadurch eine gleichmässige Basis und schnellen Ausschlag erhofften, und zwar wurde Glas in Glas destillirtes Wasser hergestellt, da ja erfahrungsgemäss das in den verschiedenen Instituten in grösseren Apparaten bereitete destillirte Wasser kleinste Beimengungen verschiedener Art enthält. — Um dem Einflusse mitübertragener Nährmengen, unter denen das Wasser zur verdünnten Nährlösung geworden wäre, zu begegnen, wurden wieder vorsichtig abgehobene, auf Agarflächen gewachsene Keime verwendet und als Suspensionsflüssigkeit für die letzteren zunächst immer das der zu impfenden Flüssigkeit gleichnamige Medium gewählt: in der ganz dichten Originalaufschwemmung trat für die kurze Dauer der Aussaat eine erheblichere Schädigung der auszusäenden Keime nachweislich noch nicht ein.

Von 20^h alter Cholera-cultur wurden 40 Oesen in 20^{ccm} Aqu. dest. ster. aufgeschwemmt (= Original), davon 5 Tropfen in 2^{ccm} (= I. Verdünnung) und 5 Tropfen in 25^{ccm} (= II. Verdünnung) destillirten Wasser übertragen, so dass also in der Originalaufschwemmung 1^{ccm} 2 Oesen, in der I. Verdünnung $\frac{1}{3}$ und in der II. $\frac{1}{36}$ Oese Cultur enthielt. Dieselben Aufschwemmungen, zu denen wir die virulente Cholera-cultur benutzten, wurden doppelt hergestellt und eine dritte Reihe von Tropfgläsern wurde in demselben quantitativen Verhältniss mit dem schon früher erwähnten, weniger virulenten Stamme besät. Von den mit virulentem Material beschickten Gläsern verblieb die eine Serie bei Zimmertemperatur (16 bis 22° C.), während die andere des gleichen Stammes, sowie die mit den avirulenten Keimen bei 37° gehalten wurden. Zur Keimzählung wurden immer zwei Platten gegossen. Die grosse Uebereinstimmung der Platten und ihrer Controlen in quantitativer Hinsicht war die Veranlassung, hier nur die Mittelwerthe der von den beiden Zählungen resultirenden Werthe anzuführen. Alle Zahlen sind auf 1^{ccm} des Inhaltes eines jeden Glases zurückgerechnet.

Dieselbe Anordnung kam dann bei einem weiteren Versuche zur Verwendung, nur wurden da zur Aussaat die Keime von 5 Tage alter Agarplatte benutzt und 50 Oesen der letzteren in 15^{ccm} Aqu. dest. ster. suspendirt. (Vgl. Tab. XI.)

Wie schon früher mitgetheilt wurde, war auch hier für die Vibrionen der älteren Cultur eine Steigerung der Haltbarkeit nicht zu constatiren, vielmehr erwiesen sich die Keime der 20^h alten Vegetation deutlich widerstandsfähiger. Während z. B. in der I. Verdünnung die jungen Keime bis zu 4 Wochen lebensfähig waren, besaßen die labileren Vibrionen der 5tägigen Cultur höchstens bis zum zweiten Tage ihr Entwicklungsvermögen. Es ist zu vermuthen, dass die Eiweisssubstanzen des älteren Bakterienplasmas ebenso wie die jeder anderen alternden Zelle bei der

Tabelle XI.

A. 20 Stunden alte Cultur.

	1.		2.		3.	
	Virulente Cultur bei 37°		Avirulente Cultur bei 37°		Virulente Cultur bei Zimmer-Temp.	
	Original	I. Verdünn. II. Verdünn.	Original	I. Verdünn. II. Verdünn.	Original	I. Verdünn. II. Verdünn.
bei Aussaat	61 000 000	8 000 000 340 000	69 000 000	11 000 000 60 000	63 000 000	9 000 000 410 000
nach 1 Tag	19 500 000	6 000 000 0	4 900 000	524 000 140	9 040 000	4 075 000 15 000
" 2 Tagen	49 000 000	550 000 0	51 000 000	5 500 000 0	86 000 000	7 500 000 300
" 3 "	40 000 000	406 000 0	50 000 000	36 000 000 0	194 000 000	1 750 000 0
" 6 "	9 000 000	0 0	37 000 000	3 600 000 0	16 000 000	16 000 0 0
" 14 "	3 046 000	0 0	21 000 000	72 000 0	10 000 000	400 0 0
" 4 Woch.	1 200 000	0 0	12 000 000	2 000 0	4 300 000	0 0 0
" 8 "	320 000	0 0	840 000	0 0	1 300 000	0 0 0
" 4 Mon.	311 000	0 0	228 000	0 0	270 000	0 0 0
" 7 "	120 000	0 0	150 000	0 0	10 000	0 0 0

B. 5 Tage alte Cultur.

bei Aussaat	48 000 000	7 000 000 300 000	38 000 000	2 300 000 90 000	45 000 000	5 000 000 250 000
nach 1 Tag	39 300 000	0 0	510 000	0 0	1 000 000	2 600 140
" 2 Tagen	70 350 000	0 0	10 000 000	0 0	53 850 000	170 0 0
" 3 "	20 850 000	0 0	21 350 000	0 0	22 300 000	0 0 0
" 3 Woch.	1 200 000	0 0	3 000 000	0 0	7 200 000	0 0 0
" 8 "	900 000	0 0	1 700 000	0 0	1 140 000	0 0 0
" 4 Mon.	200 000	0 0	850 000	0 0	970 000	0 0 0
" 7 "	50 000	0 0	430 000	0 0	380 000	0 0 0

plötzlichen Berührung mit Wasser in einen Quellungszustand gerathen, der weitere Lebensäusserungen unmöglich macht. Aber auch die Aenderung der osmotischen Druckverhältnisse wird in Erwägung zu ziehen sein. Wie A. Fischer¹ für *Clostridium butyricum* nachweisen konnte, unterscheidet sich das Verhalten der alten Bakterienzelle gegenüber der Plasmolyse darin von dem der jungen, dass bei der ersteren stärkere Plasmolyse eintrat, was Fischer darauf zurückführt, dass in der Bakterienzelle ebenso wie bei den Phanerogamen mit dem Alter der Protoplasma Gehalt abnimmt, während die jüngere Zelle einen kräftigeren Protoplasma Körper und kleineren Saft Raum führe. In gleichem Maasse wird auch die Zellmembran der auf dem trockenen und concentrirteren älteren Boden vegetirenden Keime in ihrer anatomischen Structur sich von derjenigen der jüngeren Zelle unterscheiden müssen, ihre Elasticität und Dehnbarkeit wird eine andere sein. Die Verfassung der Zellmembran aber ist von höchster Wichtigkeit für die nach Uebertragen der trockneren Keimmasse in Wasser stattfindenden Wasseraufnahme, und die Membran ist es wiederum, die dem vermehrten Druck Widerstand zu leisten hat. Dieser Druck aber muss ein ganz gewaltiger sein, wenn wir bedenken, dass sich die Zelle, um auf dem concentrirteren Nährboden existiren zu können, in einem salzreicheren Zustande befinden musste, genau so wie bei den Meeresalgen im Vergleich zu den Landpflanzen der osmotische Werth des Zellsaftes um ca. 3 Proc. Chlornatrium erhöht ist.² Das Ueberführen in das destillirte Wasser hat nun, wie wir in den zweiten Verdünnungen sehen, eine momentane Vernichtung der Zellen der älteren Vegetation zur Folge, nur wenige Keime überleben die kurze Zeit des Schüttelns. In der ersten Verdünnung zeigt sich dieselbe rapide Keimabnahme, nur in der bei der niederen Zimmertemperatur aufbewahrten Suspension vermögen einige wenige Keime zwei Tage lang die Schädigung zu tragen. Dass gerade bei höherer Temperatur die Keimvernichtung eine intensivere war, stützt wohl die oben versuchte Erklärung: bei höherer Temperatur ist erfahrungsgemäss das Eiweiss leichter quellbar, und auch der osmotische Process ist ein anderer, indem die Geschwindigkeit der Wasserbewegung mit wachsender Temperatur eine Steigerung erfährt (Krabbe).³

Im Gegensatz zu dem plötzlichen Zelltod, welchem die Keime in den beiden Verdünnungen anheimfallen, wirkt für dieselben eine Aufschwem-

¹ A. Fischer, Plasmolyse der Bakterien. *Berichte der K. Sächs. Gesellschaft der Wissenschaften*. Math.-phys. Classe. 1891. S. 62.

² Pfeffer. *Pflanzenphysiologie*. Bd. I. S. 121.

³ Krabbe, Ueber den Einfluss der Temperatur auf die osmotischen Processe lebender Zellen. *Jahrb. für wissenschaftl. Botanik*. 1896. Bd. XXIX. S. 440.

mung, in welcher auf die Cubikeinheit weit mehr Organismen treffen, weitaus günstiger. Die Concentrationsänderung bewegt sich dann eben in engeren Grenzen, eine so plötzliche Aenderung des osmotischen Druckes tritt hier nicht ein, die etwa nothwendige Turgorregulation, wenn wir an analoge Verhältnisse bei der Pflanzenzelle denken dürfen, wird wenigstens von einer grösseren Anzahl von Individuen erzielt werden. Gleichwohl nehmen wir z. B. nach 24^h eine recht beträchtliche Keimverminderung wahr (vgl. Tab. XI, Col. 2, unter 0), die möglicher Weise noch viel weiter gehend zu constatiren gewesen wäre, wenn wir in kleineren Zeitintervallen Proben entnommen hätten; nur bei der bei 37° gehaltenen dichten Aufschwemmung der älteren virulenten Cultur (Col. 2, 1. Reihe) ist dieser Abfall nicht wahrnehmbar, vielleicht nur deshalb, weil die Individuenzahl schon wieder auf dem ansteigenden Schenkel der Wachsthumscurve sich befindet; denn in der That zeigen die Organismen bei allen den hier in Frage kommenden dichten Suspensionen die übereinstimmende merkwürdige Tendenz, den zunächst erfolgten Abfall späterhin durch Erzeugung neuer Generationen nicht nur zu compensiren, sondern sogar über die ursprünglich eingesäte Zahl hinaus sich zu vermehren. Nur eine bestimmte Anzahl und Auslese von Keimen, die den neuen Verhältnissen sich accommodirt, bildet so den Stamm für weitere Generationen, für welche das neue Medium, auch wenn es als Stickstoffquelle vielleicht nur die zerstörte Zellsubstanz der todtten Keime enthält, wieder lange Zeit ausreicht, den Lebensprocess fortzusetzen. Im Anschluss an diese Beobachtung, dass in destillirtem Wasser in bestimmtem Verhältniss aufgeschwemmte Mikroorganismen unter Umständen zunächst zum grössten Theile schädigenden Einflüssen unterliegen, dass aber später eine neue Vegetation innerhalb desselben Mediums sich erhebt, sei die Bemerkung angefügt, dass dieses selbe Verhalten bei einer Reihe anderer, unten anzuführender Versuche sich beobachten liess. Wir sehen hier, wie das biologische Verhalten von Keimen innerhalb von Culturen oder deren Suspensionen durch die Keimzahl zum scharfen Ausdruck kommt, und welchen hohen Werth gerade hier quantitative Bestimmungen besitzen, die uns derartige Vorgänge getreu widerspiegeln und in ausserordentlich feiner Weise zeichnen. Dieser gleiche Vorgang wird in der Natur tausendfältig sich vollziehen — hier ein Geschlecht, das in üppiger Lebensweise unter nur günstigen Bedingungen gleichmässig rasch heranwächst, um dann in schnellem oder langsamerem steten Abfall zu Grunde zu gehen, dort ein Stamm, der bei Eintritt schwerer Noxen zum grossen Theil erlischt, dessen überlebender und den Verhältnissen sich in sorgfältiger und geschickter Weise anpassender Rest befähigt ist, gleichsam auf den Trümmern desselben Geschlechtes eine neue Blüthezeit hervorzurufen.

Das Verhalten der Keime jüngerer Culturen ist noch zum Gegenstand specieller Untersuchungen gemacht worden. Es fällt vor Allem auf, dass die weniger virulente Cultur schon in der I. Verdünnung relativ günstige Bedingungen vorfand und sich hier von beträchtlich längerer Haltbarkeit erwies als die virulente Form, die doch anderen Einflüssen gegenüber immer resistenter war. Im Anfange trotzten in den Verdünnungen die Individuen jüngerer Vegetation den Schädigungen der Concentrationsänderung und des Ueberführens in ein nährstoffreies Medium viel energischer als die der älteren Cultur, sie verstanden es sogar, durch Anschmiegen an die neuen Verhältnisse, die Art für einige Zeit zu erhalten.

In der dichten Aufschwemmung finden wir mit denen der älteren Cultur correspondirende Verhältnisse, ein Unterschied der Haltbarkeit tritt hier nicht hervor. Es verdient vielleicht noch erwähnt zu werden, dass die absolute Zahl der in den Aufschwemmungen beobachteten Keime in derjenigen der bei Zimmertemperatur gehaltenen virulenten Cultur anzutreffen war, dass also das Maximum der Individuenzahl bei niedriger Temperatur höher lag als das der bei 37° zur Entwicklung gelangten, eine Beobachtung, die man oft genug machen kann und die ihren Grund in dem bei niedriger Temperatur verminderten Stoffwechsel und den davon influirten Verhältnissen finden dürfte.

Als von hohem Interesse ist weiterhin hervorzuheben, dass die Virulenz derjenigen Choleravibrionen (Col. 1, Reihe 1), die in der dichten Aufschwemmung noch jetzt nach über 8 Monaten lebensfähig sind, in genau demselben Maasse erhalten ist wie bei der Aussaat, ein auffälliges Zeichen dafür, dass bei der Anpassung an dies mit minimalsten Nährstoffmengen versehene Medium die Eigenschaft, unter neuen Verhältnissen Gifte zu bilden, in keiner Weise beeinträchtigt zu werden braucht.

Uebrigens ist die Colonieenbildung der in den dichten Suspensionen noch jetzt lebensfähigen Vibrionen im hohen Grade atypisch, nach 2- oder 3maligem Umpflanzen in erneuter Gelatine kommt jedoch die normale Form wieder zum Vorschein.

Schliesslich möchte ich nicht unterlassen mitzutheilen, dass in den beiden bei 37° gehaltenen dichten Aufschwemmungen der virulenten und weniger virulenten Choleracultur sich die typische, makroskopisch und mikroskopisch mit aller Deutlichkeit wahrnehmbare Erscheinung der Agglutininirung zeigte. Dieselbe stellte sich zwischen der 4. und 8. Woche nach Herstellen der Suspension ein und besteht jetzt noch. Dieselbe Häufchenbildung war schon früher einmal merklich als Cholerabacillen in destillirtem Wasser erwärmt wurden.

2. Verhalten von Cholerabacillen im Leitungswasser.

In einem früheren Versuche war es aufgefallen, dass die Cholera-keime in unserem Leitungswasser fast ebenso rasch zu Grunde gingen wie im destillirten Wasser. Durch die Beobachtungen v. Nägeli's aufmerksam gemacht, kam mir der Verdacht, dass sich hier ebenfalls oligodynamische Einflüsse geltend machen könnten, in dem Sinne, dass vielleicht von der Metallleitung keimschädigende Substanzen in das Wasser übergehen könnten.

1. Wirkt das Leitungswasser oligodynamisch?

Es wurden Tropfgläser derart gereinigt, dass von der Wandung schädliche Einwirkungen ausgeschlossen wurden. Nach v. Nägeli verschwanden diese ja bei Behandlung der Gläser mit Salzsäure. Die Gläser blieben $\frac{1}{2}$ h mit 10 procent. Salzsäure in Berührung. Unter dem starken Strahl der Leitung wurde sodann die Säure durch häufiges Spülen entfernt, darnach wurden die Gläser mit von Glas in Glas destillirtem Wasser des Oeffteren nachgespült. In je 2 Gläser wurden nun je 25^{cem} Leitungswasser (= „gestanden“) aus einem Hahn gegeben, der 16 h lang nicht geöffnet gewesen war, vorher aber zu reichlicher Wasserentnahme gedient hatte. Aus demselben Hahne wurden nach 5' langem Laufenlassen in stärkstem Strahle (18 Liter pro 1') ebenfalls je 25^{cem} (= „gelaufen“) in Gläser gegeben. Nach 1 h langem Sterilisiren der Gläser im Dampf erhielt jedes 3 Tropfen einer Aufschwemmung von 3 Oesen 20stündiger Cultur in 3^{cem} Aqu. dest. ster. Aufbewahren der Proben bei 25° C.

Die Keimaussaatmenge wurde am Anfang und Ende der Gläserinficirung besonders bestimmt. Die Zahlen bedeuten den Keimgehalt in 25^{cem}.

- Tabelle XII.

	Aussaat	Leitungswasser gelaufen	Controle	Leitungswasser gestanden	Controle	Aussaat
Beginn des Versuches	12 000 000	10 600 000	13 000 000	6 400 000	7 500 000	11 800 000
nach 1 ^h	—	7 000	87 000	0	0	—
„ 2 ^h	—	0	900	0	0	—
„ 4 ^h	—	0	0	0	0	—

Dieselbe Frage behandelt ein weiterer Versuch, der gleichzeitig den Einfluss der Dampfsterilisirung feststellen will.

2. Wie verhalten sich Cholerakeime im sterilisirten und nicht-sterilisirten Leitungswasser?

Das 10^h mit dem Ende des Leitungsrohres in Berührung gewesene Wasser wurde hier in Vergleich gebracht zu solchem, das aus dem Haupthahne im Keller zur Entnahme gelangte. Hier war ein Wasser erhältlich, das nur mit den weiten gusseisernen Strassenleitungsröhren in Contact gewesen war: aus dem Haupthahne wurde das Wasser 2^h laufen gelassen, während gleichfalls zwei von demselben Rohre gespeisten, in der 2. Etage befindlichen Hähne offen standen. Die Proben, die wir mit „Kellerwasser“ und „Rohrwasser“ bezeichnen und die aus dem Auffanggefäß (mit Aqu. dest. gereinigter, steriler Jenaer Kolben) in Mengen zu je 25^{cem} durch ebenfalls mit Aqu. dest. gereinigte und sterilisierte Pipetten in sterile und in bekannter Weise gereinigte Tropfgläser gegeben waren, blieben zur Hälfte unberührt, zur anderen Hälfte wurden sie 1^h im Dampf sterilisirt, darnach wurden sie insgesamt durch Wasserbad auf die Temperatur von 25° gebracht und nun mit je 3 Tropfen einer Aufschwemmung von 5 Oesen 20stündiger Cultur in 3^{cem} Aqu. dest. ster. infect. Aufbewahrung bei 25°. Die Zahlen bedeuten den Keimgehalt von 25^{cem} und wurden auf Zehntausender abgekürzt.

Tabelle XIII.

Leitungswasser.

	Nicht sterilisirt				
	Aussaat	Kellerwasser	Controle	Rohrwasser	Controle
zu Beginn	2100	1770	2000	2070	1690
nach 2 ^h	—	700	1100	0·0035	0·007
„ 4 ^h	—	320	100	0	0
„ 10 ^h	—	1	0·8	0	0
„ 2 Tag.	—	0	0	0	0
„ 3 „	—	0	0	0	0
„ 8 „	—	0	0	0	0
„ 14 „	—	0	0	0	0

	Sterilisirt				
	Aussaat	Kellerwasser	Controle	Rohrwasser	Controle
zu Beginn	2040	1760	2000	1990	1880
nach 2 ^h	—	1400	1520	0·3	0·9
„ 4 ^h	—	820	1260	0	0
„ 10 ^h	—	600	800	0	0
„ 2 Tag.	—	200	340	0	0
„ 3 „	—	70	200	0	0
„ 8 „	—	0·24	13	0	0
„ 14 „	—	0·20	13	0	0

Die Resultate beweisen mit aller Deutlichkeit die oligodynamische Wirksamkeit des mit dem Hausleitungsrohr in Berührung gewesenen Wassers. Dasselbe wirkte, als der Hahn $\frac{3}{4}$ Tag lang geschlossen blieb, so vernichtend, dass bereits nach 1^h von 12 Millionen eingesäten Cholera-keimen nicht ein einziger mehr entwicklungsfähig sich erwies. Aber auch das 10^h lang im Rohr belassene verfügt schon über ein ganz ausgesprochenes baktericides Vermögen: von etwa 21 Millionen in 25^{cem} Wasser eingebrachten Vibrionen besitzen nach 2^h nur noch etwa 50, also 0.0024 pro mille, ihre Lebensfähigkeit. Grundverschieden davon verhält sich das der Strassenleitung entlehnte Wasser: im sterilisirten Zustande wies dasselbe noch nach 14 Tagen wachsthumsfähige Organismen auf, die genau dieselbe Virulenz wie bei der Einsaat besaßen.

Ein Blick auf die Zahlen der in den sterilisirten und nichtsterilisirten Gläsern befindlichen Keime lässt in jeder Colonne den begünstigenden Einfluss des auch nur 1stündigen Verweilens im Dampf erkennen. Nicht als ob nun bei der letzteren Art der Behandlung das Wasser durch die Ausschaltung der so oft zu Erklärungen herhaltenden „Concurrenz der Saprophyten“ in besonderem Maasse im Vortheile gewesen sei; denn in den nicht sterilisirten Proben war nach 48^h noch keine erhebliche Vermehrung der allerdings in unserem Wasser nur spärlich (0 bis 3 Keime pro 1^{cem}) vorhandenen Keime wahrzunehmen, erst nach 8 Tagen hatten diese sich reichlichen entwickelt, während Cholerakeime nach 2 Tagen und weiterhin auch mit Peptonwasseranreicherung nicht mehr nachweisbar waren. Vielmehr wurden, wie ich glaube, beim Sterilisiren von der Glaswand her Bestandtheile in's Wasser übertragen, die, bei weiterem Stehen sich vermehrend, das Keimleben günstig beeinflussten.

Es braucht wohl kaum darauf hingewiesen zu werden, dass die genannten Factoren, das Sterilisiren und die Berührung des Wassers mit der Metallleitung, die Differenzen, die hinsichtlich des Verhaltens von Cholerakeimen in Wasser bei einem Vergleich der einschlägigen Untersuchungen zu constatiren sind, ebensowohl zum guten Theil erklären dürften, wie die verschiedengradige Uebertragung von Nährsubstanz mit den Keimen in die Versuchsgläser. Wenn der Hygieniker es sich zur Aufgabe macht, das Schicksal von in's Wasser gelangten Infectionserregern zu verfolgen und das letztere gewissermassen auf seine Fruchtbarkeit hin zu prüfen, so wird er die hervorgehobenen Momente mit in Betracht ziehen müssen.

Es darf wohl noch die Vermuthung ausgesprochen werden, dass die Benutzung von solchem „oligodynamischen“ Wasser — vielleicht als Hängetropfen zur Prüfung der Beweglichkeit einer Keimart oder zur

Suspension von Bakterien, zu Verdünnungen bei quantitativen Bestimmungen u. s. w. — gar nicht so selten zu falschen Resultaten geführt haben dürfte, man braucht in der Litteratur nicht lange zu suchen, so begegnet man der „wässerigen Aufschwemmung“.

3. Ueber die Wirkung destillirten Wassers sowie über schädigenden und begünstigenden Einfluss kleinster Substanzmengen.

Es ist schon mehrmals im Verlaufe der Untersuchungen betont worden, dass oft minimalste, die Choleravibrionen treffende Anstösse, eine deutliche Reaction im Gefolge hatten. So sahen wir die Keime unter dem Einfluss der Metallrohrleitung rapid zu Grunde gehen und andererseits ward die Lebensdauer schon durch die beim Erhitzen der Glasgefässe sich lösenden Stoffe erheblich begünstigt. Um letztere Momente noch mehr zu erhärten und um weiteren Beeinflussungen durch Einwirkungen geringster Art, die sich am besten innerhalb destillirten Wassers erkennen lassen würden, nachzugehen, wurden die folgenden Versuche angestellt, deren Resultate zum Theil schon bei vorausgehenden Untersuchungen Berücksichtigung fanden, die aber der besseren Uebersicht halber hier ausführlichere Erörterung finden sollen.

Es wurde schon oben bemerkt, dass bei den Versuchen nur von Glas in Glas destillirtes Wasser zur Verwendung kam. Aber das so erhaltene Wasser konnte keineswegs als neutral im Sinne v. Nägeli's, d. h. nicht-oligodynamisch wirksam, bezeichnet werden, vielmehr wirkte dasselbe ebenfalls rasch keimtödtend. Aber andererseits verhielt es sich oft wie eine schwache Nährlösung und conservirte die Keime. Derartige Berichte sind auch in der Litteratur über die Wirksamkeit des destillirten Wassers, die aber immer nur beiläufig geprüft wurde, anzutreffen. Wie schon oben hervorgehoben wurde, ist für dies Verhalten vor Allem die mit den eingesäten Mikroorganismen übertragene Nährstoffmenge anzuschuldigen, die das destillirte Wasser zur Nährlösung macht. Aber auch bei Vermeidung des letzteren Umstandes und bei peinlichster Sauberkeit war keine Constanz zu erzielen. Die Gläser wurden allesammt nach v. Nägeli's Vorgang mit Säure behandelt, sie wurden nach anderer Vorschrift lange ausgekocht, das destillirte Wasser durch Pukall filtrirt und andere Variationen zum Vermeiden von Fehlern geschaffen, die Ungleichmässigkeit blieb noch immer. Erst als der Einfluss des Sterilisirens erkannt wurde, lenkte sich das Augenmerk auf die Löslichkeit der gewöhnlichen Glassorten. Unter Verwendung der Jenaer Glasgeräthe war es dann möglich, ein in seiner Wirksamkeit mit Sicherheit vergleichbares destillirtes Wasser herzustellen.

In den folgenden Versuchen sollte zunächst ermittelt werden, ob auch auf Bakterien minimalste Kupfermengen, so wie es v. Nägeli für Spirogyren feststellte, tödtlich zu wirken vermögen. Um die Versuchsanordnungen nicht wiederholen zu müssen, will ich auch die Resultate anderer Fragestellungen gleichzeitig wiedergeben und erörtern.

Wirkung von Kupferlösungen. Einfluss des Sterilisirens.

Zwei mechanisch gründlich gereinigte Zweipfennigstücke waren in Erlenmeyer mit 100^{cem} Aqua dest. (gewöhnliche Destillation von Glas in Glas) gegeben worden. Nach 24^h wurden von diesem Wasser je 25^{cem} in mit Säure und destillirtem Wasser gereinigte gewöhnliche Gläser gebracht. Zur Controle der Wirkung wurden je 25^{cem} Aqua dest. in Gläser gegeben. Diese sowie die Kupfergläser blieben nicht sterilisirt, während zum Vergleich zwei weitere mit 25^{cem} Aqua dest. versehene Gläschen auf 1^h in den Dampf kamen.

Vorwärmung sämtlicher Gläser auf 20° C. Inficirung eines jeden Glases mit 3 Tropfen einer Aufschwemmung von 6 Oesen 20^h alter Cultur in 6^{cem} Aqua dest. ster. Aufbewahrung bei 20°.

Die Zahlen, wie alle folgenden, bedeuten den Keimgehalt von 25^{cem} der untersuchten Suspension und sind auf Tausender abgekürzt.

Tabelle XIV.

	Aussaat	Kupfer	Controle	Aqua dest. nicht steril	Controle	Aqua dest. steril	Controle
zu Beginn	35 000	1 020	47	15 000	10 000	28 000	17 000
nach 1/2 ^h	—	0	0·1	9 000	7 000	21 000	16 000
„ 1 ^h	—	0	0	4 000	3 000	13 000	8 000
„ 2 ^h	—	0	0	100	78	11 000	2 000
„ 4 ^h	—	0	0	2	4	470	250
„ 10 ^h	—	0	0	0	0	0·6	0·07

Das Kupferwasser entfaltete demnach eine ausserordentlich starke Wirksamkeit. Da wir die Menge des in Lösung übergegangenen Metalles nicht kannten, so wurde in Zukunft nur mit bekannten Concentrationen gearbeitet.

In einer besonderen Versuchsreihe wurde ermittelt, dass Kupfersulfat 1:50 bis 60 Millionen noch deutliche, stärkere keimtödtende Wirkung als destillirtes Wasser äusserte, die Wirkung von 1:10 Millionen oder 1:1 Million war schon ganz erheblich. Wir benutzten daher für weitere

Versuche die erstere Concentration, die ja ungefähr der von v. Nägeli verwandten Lösung entspricht.

Der nächste Versuch, dem die gleiche Fragestellung wie dem vorausgehenden zu Grunde lag, sollte gleichzeitig prüfen, ob kleinste Peptonmengen die schädigende Kupferwirkung zu paralysiren vermöchten.

Versuchsanordnung: 10 Oesen 20stündiger Cultur in 8^{cem} Aqua dest. ster., daraus 3 Tropfen in die Gläser (gewöhnliches Glas), die bei 25° C. gehalten wurden.

Tabelle XV.

	Aussaat	Aqua dest. steril	Controle	Aqua dest. nicht steril	Controle
zu Beginn	21 300	15 100	13 500	5300	7000
nach 1 ^h	—	3 200	2 200	0·875	1·2
„ 2 ^h	—	640	900	0	0·02
„ 5 ^h	—	0·5	0·15	0	0
„ 24 ^h	—	0	0	0	0
„ 2 Tag.	—	0	0	0	0
„ 8 „	—	0	0	0	0
„ 10 „	—	0	0	0	0

	Kupfer 1:50 Mill. steril	Controle	Kupfer 1:50 Mill. nicht ster.	Controle	K. 1:50 Mill. + 0·001 % Pepton ster.	Controle	K. 1:50 Mill. + 0·01 % Pept. ster.	Aussaat
zu Beginn	16 000	13 000	6600	5000	19 800	20 000	18 000	19 300
nach 1 ^h	97·2	10	0·05	0·02	16 600	8 300	15 500	—
„ 2 ^h	0·2	0·7	0	0	7 000	225	7 000	—
„ 5 ^h	0·02	0	0	0	400	30	1 160	—
„ 24 ^h	0	0	0	0	0·2	0	4	—
„ 2 Tag.	0	0	0	0	0	0	0·07	—
„ 8 „	0	0	0	0	0	0	10	—
„ 10 „	0	0	0	0	0	0	12	—

Die vorliegenden Versuche beweisen, dass die Lebensdauer unserer Mikroben durch Sterilisiren des destillirten Wassers verlängert wird. Im frisch destillirten, nicht sterilisirten Wasser hingegen gingen sie rasch zu Grunde. In paralleler Weise, nur energischer keimtödtend, wirkt die Kupferlösung, auch in ihr wurden den Keimen durch vorausgehendes Sterilisiren der Lösung günstigere Existenzbedingungen geschaffen. Von den zur Kupferlösung zugefügten Peptonmengen wirkt 0·001 Procent schon merklich, 0·01 Procent schon erheblich keimerhaltend. Die von den Organismen der letzteren Medien auf Gelatineplatten gewachsenen Colonieen waren vollkommen atypisch, innerhalb derselben fanden sich

nach 24^h nur spärliche Einzelvibrien, hingegen reichlich kräftige Spirillen. Die Virulenz erwies sich als unvermindert.

Den letzten Versuch habe ich, allerdings ohne Peptonbeigaben und nur mit nicht gekochten Medien, in Jenaer Glas wiederholt mit destillirtem Wasser, das nur in Jenaer Glas hergestellt und gehalten wurde und auch zur Herstellung der in Kolben desselben Glases vorgenommenen Lösung des Kupfersulfates diente. Das Resultat dieses Versuches weicht nur insofern von dem vorhergehenden ab, als in allen Gläsern die Keimzahl rascher abnahm, die Kupferlösung 1:50 Millionen wies schon nach 1^h, das destillierte Wasser nach 2^h keine Keime mehr auf.

Einfluss der Glaswand und Nachwirkung.

In einem Versuche hatte ich ein einzelnes gewöhnliches Glas, das vorher mit Kupferlösung 1:50 Millionen gefüllt gewesen war, nicht mit Säure gereinigt, sondern nur, nach 10' langem Offenstehen des Hahnes, unter dem Strahl der Leitung mehrmals ausgespült und mit destillirtem Wasser nachgespült. Im Vergleich mit Gläsern, die mit Säure vorbehandelt waren, hatte dies Kupferglas mit destillirtem Wasser diesem eine entschieden grössere keimtödtende Fähigkeit verliehen. Der Sicherstellung dieser „Nachwirkung“ sollten sich die nächsten Versuche widmen, wobei gleichzeitig das Verhalten der Glaswand bei verschiedenartiger Behandlung zu prüfen war.

Es wurden 4 gewöhnliche Gläser (*a, b, c, d*) mit 25^{ccm} destillirten Wassers, 4 andere (*e, f, g, h*) mit gleichen Mengen Kupferlösung beschickt und 3 Tage bei 18 bis 20° stehen gelassen, nachdem sie wenige Minuten im Dampf gehalten waren. Nach 3 Tagen ward zum Vergleich die Menge von 25^{ccm} frisch destillirten Wassers und ebenso viel frisch hergestellte Kupferlösung in Gläser (*i, k, l, m*) gebracht. Von den 3 Tage gestandenen Proben sollten *a* und *b* („Aqua dest. gestanden“), sowie *e* und *f* („Kupferlösung gestanden“) dazu dienen, das Verhalten von Keimen nach längerer Berührung des Wassers oder der Kupferlösung mit dem Glase im Vergleich zu den frisch aufgefüllten zu kennzeichnen. Von den Gläsern *g* und *h*, die 3 Tage mit Kupferlösung gestanden hatten, wurde der Inhalt in reines Glas („Kupferlösung und reines Glas“) gegeben und dafür in die mit dem Kupfer in Contact gewesenen Gläser das in den Proben *c* und *d* befindliche destillierte Wasser übertragen (Aqua dest. und Kupferglas). Nachdem die Gläser so zubereitet waren, wurden sie mit je 3 Tropfen einer Aufschwemmung von 8 Oesen 20^h alter Cultur in 7^{ccm} Aqua dest. ster. inficirt und bei 25° gehalten. Durch diese Versuchsanordnung waren die Fragen gestellt: wie sich Aqua dest., sowie Kupferlösung in gewöhn-

lichem Glase gestanden und frisch verhalten, wie die alte Kupferlösung in frisches Glas übergeführt, sowie wie das gestandene destillierte Wasser in Kupferglas gegeben auf Keime wirken würde.

Tabelle XVI.

	1.			2.	
	Aussaat	Aqua dest. gestanden	Controle	Kupferlösung gestanden	Controle
zu Beginn	14 000	11 000	10 600	7000	6600
nach 1 ^h	—	3 400	2 300	100	48
„ 2 ^h	—	1 400	900	1	0·5
„ 4 ^h	—	3·6	0·03	0	0
„ 10 ^h	—	0	0	0	0

	3.		4.		
	Aqua + Kupferlösung	Controle	Kupferlösung + reines Glas	Controle	Aussaat
zu Beginn	10 000	8000	6000	7000	12 500
nach 1 ^h	0·05	1	23	7·5	—
„ 2 ^h	0	0	0	0	—
„ 4 ^h	0	0	0	0	—
„ 10 ^h	0	0	0	0	—

	5.		6.		
	Aqua dest. frisch	Controle	Kupferlösung frisch	Controle	Aussaat
zu Beginn	8000	9300	5000	6200	11 000
nach 1 ^h	13	5	0·06	0·4	—
„ 2 ^h	0	0	0	0	—
„ 4 ^h	0	0	0	0	—
„ 10 ^h	0	0	0	0	—

Der Versuch zeigt einmal, dass destilliertes Wasser, sowie Kupferlösung durch 3 Tage langes Verweilen im Glas den Keimen günstigere Lebensverhältnisse darbieten als die soeben erst in Gläser gegebenen frischen Medien. Man hätte vielleicht einen anderen Ausgang erwarten dürfen, wenn man an die Absorption von CO₂ von Seiten der gestandenen Flüssigkeit denkt. — Im Vergleich zum destillierten Wasser wirkte sowohl die alte wie die frische Kupferlösung energischer baktericid. Die Begünstigung, welche dieselbe durch das Stehenlassen erfährt, scheint demnach die schädigende Wirkung des Kupfers nicht völlig compensiren zu können. Merkwürdiger Weise wirkt diese alte Kupferlösung aber sofort rascher keimtödtend, wenn sie in frisches Glas übergeführt wird, sie wirkt dann

etwa ähnlich wie frisch destillirtes Wasser (vergl. Colonne 4, 5). Beim Uebergiessen der alten Kupferlösung in reines Glas ist die begünstigende Substanz also im Glase geblieben. Giebt man nun in das letztere das an und für sich recht günstig wirkende gestandene destillirte Wasser, so erhält dies, — nicht augenblicklich, aber schon in kurzer Zeit, die Fähigkeit, die Keime rascher zu vernichten (Col. 3). — Auf die hierbei in Frage kommenden chemischen Vorgänge kann ich nicht näher eingehen, da ich nur Vermuthungen, keine directen Beweise anführen könnte.

Verhalten von Keimsuspensionen im gewöhnlichen und im Jenaer Glas.

Es ist in weiteren Versuchen dem Einfluss der Wandung des gewöhnlichen Glases nachgespürt und im Vergleich hierzu das Verhalten in Jenaer Glas geprüft worden. Zu diesen Versuchen war das destillirte Wasser nur in Jenaer Geräthen hergestellt und aufbewahrt worden.

Es handelte sich zunächst um die Frage, ob auch bei Verwendung von Jenaer Glas eine keimbegünstigende Wirkung, etwa nach Sterilisirung, zu constatiren wäre.

Es wurden gewöhnliche und Jenaer Gläser mit 25^{cem} Aqua dest. beschickt und 1^h im Dampf sterilisirt, darnach im Wasserbad mit einer Anzahl ebensolcher, aber nicht sterilisirter Gläser auf 25° erwärmt, mit je 3 Tropfen einer Aufschwemmung von 4 Oesen 20stündiger Cultur in 3^{cem} Aqua dest. ster. inficirt und bei 25° aufbewahrt.

Tabelle XVII.
Aqua destillata.

	Aussaat	Jenaer Glas sterilisirt	Controle	Jenaer Glas ungekocht	Controle	Gewöhl. Glas sterilisirt	Controle	Gewöhl. Glas ungekocht	Aussaat
zu Beginn	26 400	1750	1200	1900	960	15 000	19 000	2900	27 000
nach 1 ^h	—	0	0	0	0	6 000	5 000	1·4	—
„ 2 ^h	—	0	0	0	0	200	600	0·02	—
„ 5 ^h	—	0	0	0	0	0·07	0·4	0	—
„ 24 ^h	—	0	0	0	0	0	0	0	—

Das auffallendste Ergebniss dieses Versuches ist die Gleichmässigkeit des Verhaltens der Keime im Wasser des sterilisirten und nicht sterilisirten Jenaer Glases. Während im gewöhnlichen Glase, wie durch eine grössere Anzahl Versuche und auch den vorliegenden erhärtet wurde, das Sterilisiren einen beträchtlichen Vortheil für unsere Organismen bewirkte und im Gegensatz dazu immer im ungekochten destillirten Wasser eine

raschere Unterdrückung der Lebensfunctionen erfolgte, ist eine Differenz in der Wirkung dieser beiden Behandlungsweisen des Wassers im Jenaer Glas nicht wahrnehmbar. Diese Thatsache, die durch weitere Versuche erhärtet ist, bietet wohl einen scharfen Ausdruck dafür, dass das Jenaer Glas in hohem Grade unangreifbar für die Wassermoleculé ist: selbst nach 1^h langem Kochen gingen nicht so viel Bestandtheile desselben in Lösung, dass sie einen Aufschub der keimtödtenden Wirkung des destillirten Wassers hätten zur Folge haben können.

Der folgende Versuch soll entscheiden, ob das im Jenaer Glas gestandene Wasser sich anders verhalten würde, sowie ob schon die kurz dauernde Berührung von destillirtem Wasser mit der Wandung des gewöhnlichen Glases, wie sie während des Durchschüttelns der Keimsuspension erfolgt, in dem Wasser Veränderungen hervorruft.

25^{cem} Aqua dest., das nur mit Jenaer Glas in Berührung gewesen, wurde in steril. gewöhnliches Glas (Gläser *a*, *b*, *c*, *d*) und in Jenaer Glas (Gläser *e*, *f*) gegeben und darin 3 Tage bei 18 bis 20° aufbewahrt. Nach 3 Tagen wurden 25^{cem} frisch destillirten Wassers in Jenaer Glas (*g*) und gewöhnliches Glas (*h*) übertragen. Von den 3 Tage lang gestandenen Gläsern wurde aus einem Jenaer Geräth der Inhalt in frisch gereinigtes gewöhnliches Glas und andererseits das 3 Tage lang in einem gewöhnlichen Glase gehaltene Wasser in reines Jenaer Glas übergelassen. Die Gläser wurden nun mit je 3 Tropfen einer Aufschwemmung von 7 Oesen 20^h alter Cultur in 6^{cem} Aqua dest. ster. versehen und bei 20° aufbewahrt.

Tabelle XVIII.
Aqua destillata.

	1			2	3	4		5	6	
	Aussaat	Gestanden in gewöhnl. Glas	Controle	Gestanden in Jenaer Glas	Gestd. in Jen. Glas, übergeg. i. gewöhnl. Gl.	Gestd. in gew. Glas, übergeg. in Jenaer Glas	Controle	Gewöhnl. Glas, frisch	Jenaer Glas, frisch	Aussaat
zu Beginn	10 000	6500	6200	3100	4900	4100	4340	6800	2800	8500
nach 1 ^h	—	22.6	12	0	2.9	1.4	0.9	7.2	0.02	—
„ 1 ^h 50'	—	0.6	1.4	0	0.05	0	0	0.09	0	—
„ 5 ^h	—	0	0	0	0	0	0	0	0	—

In Bestätigung früherer Resultate ist aus dem vorliegenden Versuche eine conservirendere Wirkung des im gewöhnlichen Glase längere Zeit belassenen Wassers (Colonne 1 und 5) ersichtlich. Das im Jenaer Glas 3 Tage aufbewahrte Wasser (Col. 2, 6) zeigt hingegen kaum einen Unterschied gegenüber dem frisch in Jenaer Glas gegebenen. In jedem Falle

sinkt die Keimzahl im gewöhnlichen Glas allmählich ab. Giessen wir nun das im Jenaer Glas gestandene Wasser, welches erfahrungsgemäss die Keime in rapider Weise vernichtet, vor der Besäung in gewöhnliches Glas über, so genügt das kurze Verweilen in dem letzteren während des Schüttelns und der weiteren Beobachtung den Untergang unserer Organismen etwas hinauszuschieben. Das mit dem gewöhnlichen Glase 3 Tage in Contact gewesene Wasser hingegen, das, wie wir sahen, in relativ beträchtlicher Weise das Keimleben schont, verliert beim Uebergiessen in Jenaer Glas, dessen Wandung ihm nichts mitzutheilen vermag, einen Theil der begünstigenden Bestandtheile: das spricht wohl deutlich genug dafür, dass die Glaswand das Ausschlaggebende für das Verhalten war und dass schon die Manipulationen des Schüttelns den Uebertritt von Substanzen aus dem Glas in das flüssige Medium befördern.¹

Die hohe baktericide Wirksamkeit des destillirten Wassers erhellt aus allen angeführten Versuchen. Obwohl auf diesen Punkt schon von einer Reihe von Beobachtern hingewiesen worden ist, wird diese Eigenschaft des destillirten Wassers noch immer recht häufig unterschätzt und vernachlässigt, ja man glaubt sogar eine besondere Sorgfalt bei Versuchsanordnungen walten zu lassen, wenn man „ganz reines destillirtes Wasser“ zu Keimsuspensionen in Verwendung brachte. Dass unter dieser Beeinflussung nicht wenige Resultate von Desinfections- oder Erwärmungsversuchen, von Keimzählungen bei mannigfachen Gelegenheiten u. s. w. getrübt sein mögen, ist zum Mindesten sehr wahrscheinlich. Dass aber andererseits die in der Litteratur öfters erwähnte Haltbarkeit oder sogar starke Vermehrungsfähigkeit bestimmter Keimsorten im destillirten Wasser nicht auf die Eigenschaften dieses Mediums, sondern vielmehr auf die Mitgabe von Nährsubstanz mit der Keimeinsaat, auf zufällige Verunreinigung, auf den Einfluss der von der Glaswand sich lösenden Bestandtheile u. s. w. zurückzuführen sein wird, beweisen wohl die mitgetheilten Versuche zur Genüge.

¹ Nach Abschluss der Versuche bemerkte ich, dass in der botanischen Litteratur bereits dieser Einfluss der Glaswand auf Algen, *Aspergillus niger* u. s. w. constatirt worden ist. Um die Berührung der Nährflüssigkeit mit dem Glas zu verhindern, überzog Molisch (*Sitzungsberichte der mathem.-naturw. Classe der K. Akademie der Wissenschaften*, Wien 1895, S. 789) die zu Algenculturen verwendeten Gläser mit dünner Schicht von Paraffin. W. Beneke (Die zur Ernährung der Schimmelpilze nothwendigen Metalle, *Jahrbuch f. wissenschaftl. Botanik*, 1895, Bd. XXVIII, S. 487) fand, dass in böhmischen Gläsern (Kaliglas) *Aspergillus niger* bei Darreichung kalifreier Nährlösung bedeutend vegetirte, während er in derselben Nährlösung in Jenaer Glas nur weisses, zum grossen Theile submerses Mycel entwickelte. Beneke macht ausführlich auf die durch die Substanz der Culturgläser sich ergebenden Fehlerquellen, besonders bei Untersuchungen über die Nothwendigkeit von Metallen bei Pilznahrung, aufmerksam.

Ein neutral wirkendes destillirtes Wasser, wie v. Nägeli das die Spirogyrenzellen nicht schädigende nennt, existirt nach alledem für Cholera-keime nicht, vielmehr zeigte dasselbe überall da, wo das Keimleben begünstigende Momente auszuschalten waren, eine exquisite zellenvernichtende Fähigkeit. Diese Fähigkeit ging auch nicht verloren, als unlösliche Körper, wie kleinste Fliesspapierfäserchen oder feinstes Meissner Caolin, zu der Keimsuspension zugesetzt wurden. Da ich ferner in Versuchen nachweisen konnte, dass die Keimzahl mit absteigenden Concentrationen von Kupferlösung schrittweise abnahm, so dass die schwächste Lösung am geringsten baktericid, aber immer noch stärker als das destillirte Wasser selbst wirkte, so hat für uns die „oligodynamische“ Erscheinung die Bedeutung einer minimal chemisch-giftigen Wirkung, welche nur ein kurzer Schritt von derjenigen des destillirten Wassers trennt.¹

Wodurch das destillirte Wasser baktericid wirkt, kann nur vermuthet werden. Dass es der Mangel an Nährstoffen ist, der das Weiterleben unmöglich macht, ist bei längerem Verweilen von Mikroorganismen in dem nährstofffreien Medium wahrscheinlich. Diese Erklärung ist es vorwiegend, die für die Vernichtung der in Aqua dest. gegebenen Pflanzenzellen sowohl wie der Bakterien in den diesbezüglichen Arbeiten hervorgehoben zu werden pflegt, wohl schon deshalb, weil man unter Vernachlässigung miteingeführter Nährmengen oder vom Glase ausgehender Bestandtheile eben meist nur ein relativ allmähliches Absterben, ein wirkliches Verhungern eintreten sah. Die zum Theil momentane, explosive Vernichtung jedoch legt, wie ich glaube, den Gedanken nahe, dass wir noch mit anderen Factoren zu rechnen haben. So wird, wie schon oben bei dem Verhalten der Keime älterer Culturen ausgeführt wurde, auch hier der schnelle Wechsel des Mediums, das Ueberführen aus einer immerhin recht stark salzhaltigen Umgebung in ein absolut salzfreies Wasser, das nun in das Plasma eindringt und den Druck rapid steigert, unmöglich ohne Schaden ertragen werden können, genau so, wie die an Salz-

¹ In einer ausführlichen Publication, auf die ich leider erst am Schlusse meiner Arbeit aufmerksam wurde, behandelt Israël (Biologische Studien mit Rücksicht auf die Pathologie, Virchow's *Archiv*, Bd. CXLVII, S. 294) die Frage der Giftwirkung minimaler Mengen von Metallen und Metallsalzen in Wasser. Er bestätigt, dass insbesondere Kupfer dem Wasser zugefügt an einer Reihe von Organismen, den Spirogyren, Bacteriaceen und Protozoën, die schwersten Störungen hervorruft. Die Art der Zellveränderung findet er abweichend von der v. Nägeli'schen Darstellung, er nennt die „oligodynamischen“ Erscheinungen v. Nägeli's, deren Ursache auch nach Israël keine andere als die einer Giftwirkung ist, „plasmoschistisch“. Die grossen Schwankungen, die Israël bei der Einwirkung von destillirtem Wasser bemerkte, finden vielleicht auch hier in der Wirkungsweise der verwendeten Gläser eine ausreichende Erklärung.

lösung accommodirten Pflanzenzellen, plötzlich in reines Wasser gebracht, durch den vermehrten Druck zersprengt werden.² Aber wenn die vom gewöhnlichen Glase sich lösenden Stoffmengen schon genügen, die Lebensdauer der von der Cultur in Wasser gegebenen Mikroben günstig zu beeinflussen, so müssen noch andere Schädigungen als die beim plötzlichen Wechsel in Betracht kommenden osmotischen Druckverhältnisse existiren. So wird daran zu denken sein, dass auch in den Bakterienzellen Eiweisssubstanzen vorhanden sind, die in Berührung mit destillirtem Wasser zur Quellung gebracht werden. Damit gewinnt die Zelle das plumpe, schon von Braem¹ beschriebene Aussehen. Unter dem Einflusse dieses Quellungszustandes ist es wahrscheinlich, dass Bestandtheile des Zellplasmas, die für die Lebensfunction desselben unerlässlich sind, in das destillirte Wasser übergehen, so werden vielleicht Salze die Zelle verlassen, wenn die letztere nicht gar bestimmter Eiweisssubstanzen auf diese Art verlustig geht. Der plötzliche Tod würde wenigstens so am ehesten eine Erklärung finden.

Diese vorliegenden Untersuchungen möchten das Augenmerk darauf richten, wie anscheinend geringfügige Momente in die Lebensthätigkeit der Bakterien oft schon tief einzugreifen vermögen. Dieser Umstand, den wir bei der im Laboratorium üblichen künstlichen Behandlungsweise der Mikroorganismen oft genug übersehen, darf uns nicht Wunder nehmen, wenn wir uns vergegenwärtigen, wie klein der Zellkörper dieser Lebewesen ist, wie minimal nur der Angriffshebel zu sein braucht, und wenn wir bedenken, dass die kleinsten Mengen einer Substanz ihre Thätigkeit schon deshalb so sicher zu entfalten in der Lage sind, weil der winzige Zelleib mit seiner relativ grossen Oberfläche allseitig in reichem Maasse Angriffspunkte für von aussen kommende Einwirkungen besitzt. Diese kleinsten Wirkungen aber vollziehen sich in der Natur ebensowohl wie im Reagensglase und dort in viel ausgiebigerem Maasse, weil hier die Stetigkeit des Wirkens fördernd hinzutritt und so die gewaltigsten Leistungen erzielt.

Diese Erkenntniss der Wirkung kleinster Kräfte auf die Mikroorganismen erfordert in gleicher Weise das Interesse des Biologen, dem gerade in den rasch vegetirenden Spaltpilzen die denkbar geeignetsten Zellen für eine Reihe wichtiger Untersuchungen zur Verfügung stehen, wie auch des Hygienikers, der Seuchen entstehen und erlöschen sieht, der das Verhalten der Krankheitserreger in der Aussenwelt prüft und ihre Vernichtung erstrebt.

¹ Pfeffer, *Pflanzenphysiologie*. 1897. Bd. I. S. 122.

² Braem, Untersuchungen über die Degenerationserscheinungen pathogener Bakterien im destillirten Wasser. *Inaugural-Dissertation*. Königsberg 1889.

Wenn es zunächst von Wichtigkeit erschien, durch die mitgetheilten Untersuchungen manche Versuchsfehlerquellen aufzudecken und auf die durch Vernachlässigung auch nur kleiner und indifferent erscheinender Momente resultirenden Schwankungen experimenteller Ergebnisse hinzuweisen und damit einige, für den im Laboratorium Arbeitenden verwerthbare Erfahrungen zusammenzustellen, so dürften doch auch, wie ich glaube, einzelne dieser Beobachtungen für die praktische Hygiene und Epidemiologie nicht ganz bedeutungslos erscheinen.

So dürfte beispielsweise zu beachten sein, dass eine eintretende Befuchtung, sei sie nun Nebel oder Thau oder Regen, der für andere lebende Gebilde befruchtend wirkt, für Keime, die vorerst der Trocknung ausgesetzt waren, schwerste Schädigung und Vernichtung herbeizuführen vermag. — Auch werden wir in der Wirklichkeit damit zu rechnen haben, dass in der vor Trocknung geschützten Luft selbst die der Nährsubstanzen nahezu entbehrenden und inmitten ihrer Stoffwechselproducte lebenden Keime eine ganz erheblich lange Conservirung erfahren, die um so nachhaltender sich erweist, je weiter die Temperatur herabsinkt. — Wenn ferner selbst im reinsten Wasser die Keime, sofern sie sehr dicht suspendirt waren, eine beträchtliche Haltbarkeit zeigten, hingegen bei reichlicher Wasserzugabe einer raschen Vernichtung anheimfielen, so ist damit die Gefahr der Tümpel und stehenden Gewässer ebenso gekennzeichnet wie der Segen einer reichlichen Wasserversorgung und der Reinlichkeit in Haus und Hof. Schliesslich ist vielleicht noch darauf hinzuweisen, dass es für ein Gemeinwesen von höchster Bedeutung sein wird, wenn das Wasser desselben durch einen Aufenthalt weniger Stunden im Rohr der Hausleitung eine hervorragend baktericide Fähigkeit erhält, die der eines energischen Desinfectionsmittels, wenigstens für Cholerakeime, nicht nachsteht. Dass dies Moment für die Verbreitungsweise von Epidemieen von Belang sein dürfte, ist wohl in hohem Maasse wahrscheinlich.
