

[Statens Seruminstitut, Kopenhagen.]

## Zur Theorie der Desinfektion I.<sup>1</sup>

Von

Th. Madsen und Max Nyman (Helsingfors).

---

### Einleitung.

Trotz einer sehr bedeutenden Arbeit hat man noch nicht eine einheitliche Wertbestimmung der chemischen Desinfektionsmittel erreicht. Die besten Untersuchungen von den letzten Jahren sind das in mehreren Beziehungen bahnbrechende Werk von Krönig und Paul<sup>2</sup>, denen wir eine Technik verdanken, die nicht mit vielen von den Versuchsfehlern behaftet sind, die an den früheren Untersuchungen dieser Art kleben.

Wie bekannt, benutzten diese Forscher Milzbrandsporen auf böhmischen Granaten eingetrocknet, die dann bei konstanter Temperatur dem Desinfektionsmittel, meistens Sublimat, ausgesetzt wurden. Nach verschiedenen Zeiten wurden einige Granaten herausgenommen und das Sublimat wurde mittels Schwefelammonium in inaktives Quecksilbersulfid umgesetzt; die Milzbrandsporen wurden durch Schüttlung von der Oberfläche der Granaten entfernt und durch Plattenverfahren wurde die Zahl der noch keimfähigen Sporen ermittelt.

Die größte Schwierigkeit bei diesen Untersuchungen ist, daß die auf Granaten eingetrockneten Milzbrandsporen immer ihre Resistenz ändern, selbst wenn sie bei niedriger Temperatur konserviert werden. Um doch eine Vorstellung von der Sensibilität der Sporen im Versuchsaugenblicke zu haben, geben Paul und Krönig für jeden Versuch eine „Vergleichszahl“

---

<sup>1</sup> Früher teilweise in der Biologischen Gesellschaft in Kopenhagen 1905 und der Königl. dänischen Akademie der Wissenschaften 1907 veröffentlicht.

<sup>2</sup> Krönig und Paul, Die chemischen Grundlagen der Lehre von der Giftwirkung und Desinfektion. *Diese Zeitschrift*. 1897. Bd. XXV.

an, z. B. „HgCl<sub>2</sub> 16 Liter 3 Min. 157 Kol.“ d. h. daß, wenn die betreffende Sporenemulsion bei konstanter Temperatur von 18° einer Sublimatlösung von der Konzentration 1 Mol. in 16 Liter Wasser während 3 Minuten ausgesetzt wurde, dann noch 157 Kolonien sich auf Agar entwickelten. Mit dieser „Vergleichszahl“ als Ausgangspunkt untersuchten Verff. die Variationen der Desinfektionswirkung unter verschiedenen Bedingungen.

In untenstehender Tabelle I ist angegeben, wie viele Sporen nach 6 Minuten noch keimfähig sind, nachdem sie der Einwirkung von Sublimatlösung, mit steigenden Mengen von Chlornatrium versetzt, ausgesetzt waren.

Tabelle I.

[Krönig u. Paul, *Diese Zeitschrift*. Bd. XXV. S. 47.]

Granate Nr. 15.

Vergleichszahl:

Bacillus anthracis (Spore).

HgCl<sub>2</sub> 16 Liter, 6 Min., 8 Kol.

Lösung				Prozentgehalt	6 Minuten
1.	HgCl <sub>2</sub>	. . . . .	16 Liter	1.69	8 Kolonien
2.	HgCl <sub>2</sub>	+	1.0 NaCl	HgCl <sub>2</sub> 1.69 + NaCl 0.365	32 „
3.	„	+	2.0 „	„ 1.69 + „ 0.73	124 „
4.	„	+	3.0 „	„ 1.69 + „ 1.095	282 „
5.	„	+	4.0 „	„ 1.69 + „ 1.46	382 „
6.	„	+	4.6 „	„ 1.69 + „ 1.68	410 „
7.	„	+	6.0 „	„ 1.69 + „ 2.19	803 „
8.	„	+	10.0 „	„ 1.69 + „ 3.65	1087 „

Die Tabelle zeigt deutlich, wie der Dissoziationsgrad der Sublimatlösung mit steigender Einhalt von Chlornatrium abnimmt. Durch eine solche Versuchsreihe bekommt man doch keinen rationellen Maßstab für die Abnahme des bakteriziden Vermögens in jedem Falle.

Unter dem Einflusse des Sublimats bei konstanter Temperatur sinkt die Sporenzahl schnell, dann aber immer langsamer. Als Beispiel erwähnen wir den Versuch in Tabelle II, den wir nach der Arbeit von Paul und Krönig berechnet haben. Es handelt sich um einen Desinfektionsversuch mit Sublimatlösung auf Milzbrandsporen an Granaten eingetrocknet.

Tabelle II.

[Paul u. Krönig, *Zeitschrift f. physikal. Chemie*. Bd. XXI. S. 421.]

t	a-x obs.	a-x calc.	t	a-x obs.	a-x calc.
2	1950	1950	14	13	13.5
4	578	851	16	5	5.9
6	327	372	18	3	2.6
8	160	162	20	2	1.1
10	94	71	22	1	0.5
12	34	31	24	0	0.2

$K = 0.18$

Tabelle III.

[Krönig u. Paul, *Diese Zeitschrift*. Bd. XXV. S. 28.]

$t$	Mercurichlorid $\text{HgCl}_2$									
	16 Liter		32 Liter		64 Liter		128 Liter		256 Liter	
	( $a-x$ ) obs.	( $a-x$ ) calc.	( $a-x$ ) obs.	( $a-x$ ) calc.	( $a-x$ ) obs.	( $a-x$ ) calc.	( $a-x$ ) obs.	( $a-x$ ) calc.	( $a-x$ ) obs.	( $a-x$ ) calc.
2	549	549	—	—	—	—	—	—	—	—
3	323	331	678	678	—	—	3829	3829	—	—
4	236	199	—	—	—	—	—	—	—	—
5	138	120	—	—	961	961	—	—	—	—
6	82	72	310	260	—	—	2069	2352	—	—
7	42	44	—	—	—	—	—	—	—	—
8	19	26	—	—	—	—	—	—	—	—
9	—	—	168	99	—	—	—	—	—	—
10	10	9.5	—	—	397	331	520	1228	2027	(1009)
12	1	3.5	38	38	—	—	—	—	—	—
14	0	1.3	—	—	—	—	—	—	—	—
15	—	—	10	15	178	151	302	544	749	749
18	—	—	5	5.6	—	—	—	—	—	—
20	—	—	—	—	41	60	231	242	612	556
21	—	—	3	2.1	—	—	—	—	—	—
24	—	—	2	0.8	—	—	—	—	—	—
25	—	—	—	—	9	24	121	107	432	413
27	—	—	1	0.3	—	—	—	—	—	—
30	—	—	0	0.1	7	9.4	46	48	306	306
35	—	—	—	—	3	3.7	21	21	227	227
40	—	—	—	—	2	1.5	7	9.4	183	169
45	—	—	—	—	1	0.6	—	—	151	125
50	—	—	—	—	1	0.2	5	1.8	133	93
55	—	—	—	—	1	0.1	—	—	—	—
60	—	—	—	—	1	0.04	1	0.4	79	51
70	—	—	—	—	—	—	1	0.07	16	28
80	—	—	—	—	—	—	0	0.01	10	16
90	—	—	—	—	—	—	—	—	5	8.6
100	—	—	—	—	—	—	—	—	3	4.7
110	—	—	—	—	—	—	—	—	3	2.6
120	—	—	—	—	—	—	—	—	2	1.4
	$K =$ 0.22		$K =$ 0.139		$K =$ 0.08		$K =$ 0.0706		$K =$ 0.0259	

Tabelle IV.

[Krönig u. Paul, *Diese Zeitschrift*. Bd. XXV. S. 47.]

$t$	HgCl <sub>2</sub> . . . 16 Liter		HgCl <sub>2</sub> + 2 NaCl 16 Liter		HgCl <sub>2</sub> + 4·6 NaCl 16 Liter	
	( $a-x$ ) obs.	( $a-x$ ) calc.	( $a-x$ ) obs.	( $a-x$ ) calc.	( $a-x$ ) obs.	( $a-x$ ) calc.
2	321	321	1280	1280	—	—
3	—	—	—	—	1689	1689
4	64	61	429	510	—	—
5	18	27	—	—	—	—
6	11	12	257	203	566	597
7	11	5·1	—	—	—	—
8	9	2·2	86	81	—	—
9	—	—	—	—	209	211
10	3	0·4	23	32	—	—
12	0	0·03	7	13	75	75
14	—	—	5	5·1	—	—
15	—	—	—	—	23	26
16	—	—	4	2	—	—
18	—	—	2	0·8	8	9·3
20	—	—	1	0·3	—	—
21	—	—	—	—	4	3·3
24	—	—	0	0·05	3	1·2
27	—	—	—	—	3	0·41
30	—	—	—	—	2	0·15
36	—	—	—	—	1	0·02
39	—	—	—	—	1	0·006
	$K = 0·36$		$K = 0·2$		$K = 0·1506$	

Tabelle V.

5 Stück Granaten werden (mit der Hand) mit 3<sup>cem</sup> Wasser geschüttelt und mit steriler Chlornatriumlösung zu einem Volumen von 200<sup>cem</sup> verdünnt. Von dieser Ausschüttelung wird 1<sup>cem</sup>, 0·5<sup>cem</sup> und 0·2<sup>cem</sup> herausgemessen und die Keimzahl durch Agarplatten ermittelt.

	Observation der Keimzahl nach		Totalanzahl Keime pr. 5 Granaten	
	24 Stunden	72 Stunden	24 Stunden	72 Stunden
1·0 <sup>cem</sup>	226	225	} 42 900	42 900
1·0 „	203	204		
0·5 „	103	133	} 42 400	49 200
0·5 „	109	113		
0·2 „	53	68	} 41 500	52 500
0·2 „	30	37		
			42 267	48 200

In der ersten Kolonne ist unter  $t$  die Zeit in Minuten aufgeführt. In der folgenden ist unter  $(a-x)$  obs. angegeben, wie viele Sporen nach  $t$  Minuten Sublimatwirkung mit nachfolgender Ammoniumsulfidbehandlung noch keimfähig sind.

Die Abnahme der Kolonien mit der Zeit geht ganz regelmäßig und ihr gegenseitiges Verhältnis läßt sich mit guter Annäherung durch dieselbe Formel ausdrücken, die für die sog. monomolekulären Reaktionen gültig ist, gleich

$$\frac{dx}{dt} = K(a-x),$$

wo  $(a-x)$  die Zahl von Kolonien angibt, die an der Zeit  $t$  gefunden werden, und wo  $K$  eine Konstante ist, welche die Reaktions- oder Desinfektionsgeschwindigkeit ausdrückt. In der dritten Kolonne der Tabelle II findet man unter  $(a-x)$  calc. die nach dieser Formel und mit der Konstante  $K$  berechnete Anzahl von Kolonien. Wenn man die großen Versuchsfehler, die an dieser Art von Untersuchungen kleben, in Betracht nimmt, ist die Übereinstimmung eine recht gute.

Wenn man eine solche Behandlungsweise der Desinfektionsbestimmungen, wie die hier vorgeschlagene, durchführen könnte, wäre eine größere Übersichtlichkeit als bisher zu erreichen, da man in der Konstante  $K$  einen zahlenmäßigen Ausdruck der Desinfektionskraft unter den gegebenen Versuchsbedingungen (Desinfektionsmittel, Medium, Sporen, Temperatur usw.) besitzt.

Ein anderes Beispiel ist in der Tabelle III wiedergegeben.

Hier sind die Wirkungen von verschiedenen Sublimatkonzentrationen auf Milzbrandsporen verglichen. In der Kolonne  $(a-x)$  calc. sind, wie oben, die nach der erwähnten Formel berechneten Werte angegeben.

In ähnlicher Weise sind an der Tabelle IV einige von Paul und Krönig mitgeteilte Versuche berechnet, wo die Desinfektionsfähigkeit des Sublimats mit und ohne Chlornatrium untersucht ist.

### Technik.

Der Zweck von unseren eigenen Versuchen war hauptsächlich, den Einfluß der Temperatur auf die Desinfektionsgeschwindigkeit zu studieren. Unsere Methodik stimmte im großen und ganzen mit der von Paul und Krönig angegebenen überein. Wegen ihrer sehr wechselnden Oberflächen und Dimensionen scheinen die böhmischen Granaten wenig geeignet als Träger der Milzbrandsporen zu dienen, und es wäre ohne Zweifel ein Fortschritt, wenn man etwas mehr egales finden könnte. Doch konnten wir wie Paul und Krönig feststellen, daß man durch sorgfältige Arbeit bei dieser Methode recht übereinstimmende Zahlen erreichen kann (vgl. z. B. Tabelle V).

Um die Sporen von der Granatenoberfläche zu entfernen, benutzten Paul und Krönig folgendes Verfahren. Für jede Bestimmung wurden gewöhnlich sechsmal 5 Granaten benutzt. Nach Einwirkung des Sublimats wurden die Granaten in Wasser abgespült und dann mit Ammoniumsulfid behandelt. Nach Abspülung mit Wasser werden je 5 Granaten in einem Reagensröhrchen mit 3<sup>cem</sup> Wasser versetzt. Alle die Röhrchen werden in einen Drahtkorb gestellt und 3 Minuten energisch geschüttelt. Dann werden 12<sup>cem</sup> geschmolzenes Agar, auf 42° gekühlt, in die Röhrchen gegossen. Nach sorgfältiger Mischung des Agars mit der Sporenemulsion wird der Inhalt in eine Petrischale gegossen. Nach Verlauf von ein oder mehreren Tagen werden die Kolonien gezählt. Nach Schüttelung mit der Hand während 3 Minuten ist das Resultat häufig sehr variierend, wie es aus den Versuchen von Paul und Krönig und den unsrigen hervorgeht. Diese Fehlerquelle kann zwar dadurch etwas vermindert werden, daß man das Mittel einer großen Zahl von Versuchen nimmt. Wir haben es doch vorgezogen, diese Operation mit der Schüttelmaschine 3 Minuten vorzunehmen. Wie die Resultate hierdurch regelmäßiger werden, ist aus Tabelle VI ersichtlich. Hier ist eine Vergleichung angestellt mit der Kolonienzahl von je 5 Platten, von 5 mit der Hand geschüttelten Granaten stammend, und mit der Kolonienzahl von 5 anderen Platten, deren Granaten in der Schüttelmaschine behandelt waren.

Tabelle VI.

Handgeschüttelt	Schüttelmaschine
250—374—325—669—551	520—554—534—530—536

Ferner haben wir die Methode in der Weise modifiziert, daß wir statt 25 oder 30 Granaten in Serien von je 5 Granaten untersuchten, sämtliche Granaten auf einmal geschüttelt haben. Häufigst haben wir 25 Granaten verwendet. Man tut sie in eine flache, viereckige Flasche, gießt 15<sup>cem</sup> Wasser dazu, schließt mit einem Kautschukstöpsel und schüttelt in horizontaler Stellung in der Maschine während 3 Minuten. Endlich werden 3<sup>cem</sup> von der Sporenaufschwemmung (eventuell nach Verdünnung) herausgemessen und zu Platten verarbeitet. Die Kolonienzahl der auf diese Weise verarbeiteten Platten variiert so wenig, daß wir in einem Teile der Versuche uns mit 4 statt wie gewöhnlich mit 5 oder 6 begnügten, ohne größere Verminderung der Genauigkeit zu bemerken. Anfangs bearbeiteten wir die Platten ganz nach Krönig und Paul, welche die Mischung von Sporenemulsionen mit Agar in den Röhrchen vornahmen, um dann den Inhalt in die Petrischalen zu gießen. Bequemer ist doch,

die 3<sup>cem</sup> Bakterienemulsion direkt in die Petrischale zu überführen und dann 12<sup>cem</sup> geschmolzenen Agar zuzufügen. Mit einem Platindraht werden die zwei Flüssigkeiten leicht innig gemischt, wodurch eine einförmige Verteilung der Kolonien auf der Platte erreicht wird.

Die Zubereitung des Nähragar geschah ganz nach Krönig und Paul.

Die Zunahme von Tag zu Tag der Kolonienzahl einer Agarplatte mit sublimatbehandelten Milzbrandsporen ist sehr verschieden und hängt von der Anzahl der Kolonien ab. Wenn mehr als etwa 500 Kolonien

Tabelle VII.

Sublimat 128 Liter. Temp. 25°.

Für jede Zeit (2, 4, 7 Min. usw.) sind 5 × 5 Granaten benutzt, die nach Sublimat-Schwefelammoniumbehandlung mit der Hand mit 3<sup>cem</sup> Wasser ausgeschüttelt wurden. Diese 3<sup>cem</sup> wurden dann ohne weitere Verdünnung zu Agarplatten verarbeitet.

Tag	Platten Nr.					Mittel
	1	2	3	4	5	
			<b>2 Min.</b>			
1	4176	3744	3999	3648	4016	3917
			<b>4 Min.</b>			
1	2648	1760	2360	1696	2640	2221
2	2240	1952	2560	1544	2320	2123
			<b>7 Min.</b>			
1	1744	752	840	968	1420	1145
2	1512	904	840	1084	1384	1145
			<b>10 Min.</b>			
1	250	374	325	669	551	434
2	372	564	700	1020	764	685
			<b>15 Min.</b>			
1	124	76	155	179	?	134
2	504	267	584	632		497
			<b>20 Min.</b>			
1	7	2	4	3	5	4.2
2	152	89	230	245	246	192
3	153	94	227	231	231	187
			<b>25 Min.</b>			
1	6	2	2	4	3	3.4
2	70	75	54	45	99	69
3	80	98	49	48	124	80
			<b>30 Min.</b>			
1	0	0	0	0	0	0
2	1	2	0	1	1	1
3	1	3	0	1	1	1.2

Tabelle VIII.

Sublimat 256 Liter. Temp. 25°.

Für jede Zeit (5 Min., 10 Min. usw.) wurden 30 Granaten verwendet, die nach Sublimat- und Schwefelammoniumbehandlung in Schüttelmaschine 3 Minuten mit 18<sup>ccm</sup> Wasser ausgeschüttelt wurden. Für jede Platte wurden 3<sup>ccm</sup> benutzt nach Verdünnung: für 5 Min. 5 mal, — für 10 Min. 4 mal, — für 15 Min. 3 und für 20 Min. 2 mal.

Tag	Platte Nr.					Mittel	Verdünnung	pr. 5 Granaten berechnet
	1	2	3	4	5			
			5 Min.					
1	836	820	832	772	824	817	5	4085
2	864	816	805	824	832	828	—	4140
3	848	800	816	792	808	813	—	4065
			10 Min.					
1	520	554	534	530	536	535	4	2140
3	522	528	548	560	534	538	—	2152
3	496	548	508	540	552	529	—	2116
			15 Min.					
1	305	291	282	318	318	303	3	909
2	310	314	328	360	352	333	—	999
3	324	352	328	392	328	345	—	1035
			20 Min.					
1	142	155	136	173	172	156	2	312
2	230	235	196	255	251	233	—	466
3	213	238	216	242	242	230	—	460
			25 Min.					
1	88	94	96	78	74	86	1	86
2	212	214	233	227	190	215	—	215
3	218	232	246	234	192	224	—	224
			30 Min.					
1	9	5	8	3	6	6.2	1	6.2
2	32	31	39	20	25	29	—	29
3	38	35	44	22	30	34	—	34
			40 Min.					
1	1	0	0	0	0	0.2	1	0.2
2	5	2	2	1	1	2	—	2
3	5	2	2	1	1	2	—	2

pro Platte anwesend sind, wird die größte Kolonienzahl, die makroskopisch beobachtet werden kann, häufig schon nach 24 Stunden entwickelt sein. Die mikroskopische Untersuchung zeigt eine bedeutend größere Anzahl. An den folgenden Tagen wird diese Zahl ungeändert bleiben oder sinkt unter die von dem ersten Tag, da ein Teil der Kolonien zusammenwachsen, wodurch die Zählung ungenau wird. Eine Kolonienzahl



zwischen 200 und 500 am ersten Tag wird bisweilen am zweiten Tag etwas zunehmen, während die Zunahme am dritten und vierten Tag eine sehr kleine ist.

Finden sich am ersten Tag weniger als 200 Kolonien pro Platte, wird die Zunahme vom ersten zum zweiten Tag eine verhältnismäßig sehr große sein, vom zweiten zum dritten Tag aber dann eine sehr kleine.

Siehe die Versuche von Krönig und Paul und die Tabelle VII und VIII.

Nach Verlauf von 3 Tagen haben wir in unseren Versuchen keine Entwicklung von neuen Kolonien bemerkt. Bei großer Dichtigkeit von Kolonien kommen also eine große Menge von Sporen nicht zu makroskopisch erkennbarer Entwicklung. Man läuft dann Gefahr, daß man nicht mit Recht die Zahlen der dicht und der spärlich besäten Platten vergleichen kann. Deswegen haben wir immer versucht, nach der Schüttung die Sporenemulsion so zu verdünnen, daß nicht mehr als etwa 200 Kolonien pro Platte kommen. Gewöhnlich konnten wir dieses ohne Schwierigkeiten machen, da wir immer die Totalmenge der auf den Granaten eingetrockneten Keime kannten, und mit Leitung hiervon Vorversuche angestellt haben.

Tabelle IX.

12 Granaten werden in Schüttelmaschine 3 Minuten mit 6<sup>ccm</sup> Wasser geschüttelt. 2<sup>ccm</sup> hiervon werden mit destilliertem Wasser auf 200<sup>ccm</sup> verdünnt. Andere 2<sup>ccm</sup> wurden auf 200<sup>ccm</sup> mit 0.9 proz. NaCl-Lösung verdünnt.

Tag	Wasser		Chlornatrium	
	3 <sup>ccm</sup>		3 <sup>ccm</sup>	
1	122		109	
2	120		120	
4	120		120	
	I	II	I	II
	1 <sup>ccm</sup>		1 <sup>ccm</sup>	
1	35	44	40	29
2	37	44	39	29
4	37	45	39	29
	0.5 <sup>ccm</sup>		0.5 <sup>ccm</sup>	
1	18	14	15	25
2	18	15	15	25
4	18	15	15	25
Mittel aus allen 3 Versuchen		114	114	

Zur Verdünnung benutzten wir immer eine verhältnismäßig große Menge (5<sup>cem</sup>) der Sporenemulsion, die dann unter sorgfältiger Schüttlung in ein größeres Volumen destilliertes Wasser verdünnt wurde. Wie aus Tabelle 9 ersichtlich, gibt es keinen deutlichen Unterschied, ob die Verdünnung mit destilliertem Wasser oder mit 0.9 prozentiger Chlornatriumlösung bereitet wird.

In allen unseren Versuchen haben wir festgestellt, wieviele keimfähige Sporen die Granaten vor der Sublimatwirkung besaßen. Nach Krönig und Paul hat die Schwefelammoniumbehandlung keinen merkbaren Einfluß auf die Kolonienzahl; dieses geht auch aus den Versuchen Tabelle X und XI hervor.

Tabelle X.

4 Granaten werden mit 10<sup>cem</sup> Wasser ausgeschüttelt, die dann auf 400<sup>cem</sup> verdünnt werden. Observation 2 Tage hindurch.

1 <sup>cem</sup>			Mittel	Keimzahl auf 5 Granaten berechnet
272	292	336	300	150 000
0.5 <sup>cem</sup>				
140	162	138	147	147 000
				<hr/> Mittel: 148 500

Tabelle XI.

2 × 20 von denselben Granaten wie im vorigen Versuch (A und B) werden mit destilliertem Wasser bei 25° hingestellt. Nach 5 Minuten werden sie herausgenommen und durchlaufen ganz dieselben Prozesse wie die sublimatbehandelten: sie werden gespült, mit Ammoniumsulphid behandelt, wieder gespült, mit 12<sup>cem</sup> Wasser ausgeschüttelt, das auf 20<sup>cem</sup> verdünnt wird. Hiervon werden ferner 5<sup>cem</sup> mit 395<sup>cem</sup> Wasser versetzt.

Observationszeit 2 Tage. 1<sup>cem</sup> pro Platte.

				Mittel	pro 5 Granaten Keimzahl
A	394	400	372	389	155 600
B	424	384	302	370	148 000
					<hr/> Mittel: 151 800

In anderen Fällen scheint die Schwefelammoniumbehandlung doch die Sporenzahl bedeutend zu verringern.

Bei Bakterienzählungen sind die Versuchsfehler selbstverständlich sehr bedeutend. Von ihrer Größe gibt der folgende Versuch eine Vorstellung. Es wurde untersucht die Desinfektionsflüssigkeit von Sublimat, Konzentration 256 Liter, nach Verlauf von 2, 4, 7, 10, 15, 20, 35 und 60 Minuten. Temperatur 25°.

Es wurden 2 Serien von je 20 Granaten angestellt, die selbständig bearbeitet wurden, so daß das Experiment 2 Reihen I und II umfaßte.

Tabelle XII.

Serie I						Serie II					
1	2	3	Mittel	Verdün- nung	Keimzahl pro 5 Gran.	1	2	3	Mittel	Verdün- nung	Keimzahl pro 5 Gran.
193	2 Min. 380	254	259	100	25 900	336	2 Min. 280	Infiz.	308	100	30 800
228	4 Min. 258	Infiz.	243	50	12 150	160	4 Min. 169	170	166	50	8 300
502	7 Min. 450	490	480	12	5 760	329	7 Min. 346	Infiz.	338	12	4 056
228	10 Min. 230	223	227	8	1 816	273	10 Min. 294	252	273	8	2 184
388	15 Min. 401	332	374	1	374	494	15 Min. 544	505	509	1	509
232	20 Min. 189	254	225	1	225	229	20 Min. 168	Infiz.	199	1	199
1	35 Min. 11	4	5.3	1	5.3	2	35 Min. 2	3	3.3	1	3.3
1	60 Min. 0	0	0.3	1	0.3	1	60 Min. 1	Infiz.	1	1	1

Mit größerer Übung und einer großen Anzahl von Versuchen (Zeiten und Agarplatten) können die Versuchsfehler indessen bedeutend herabgebracht werden.

### Einfluß der Temperatur.

Für unsere Versuche benutzten wir ein Ostwaldsches Wasserbad mit Toluolregulator und elektrischem Rührer. Die Temperaturschwankungen überschritten nicht  $1/25^{\circ}$  und waren gewöhnlich viel kleiner. Die benutzte Sublimatlösung hatte eine Konzentration von 256 Liter.

Der Versuch Tabelle XIII vergleicht die Desinfektionsgeschwindigkeit bei  $45^{\circ}$ ,  $35^{\circ}$  (2 Versuchen) und bei  $25^{\circ}$ .

Vor der Sublimateinwirkung waren 124 800 Sporen (auf 5 Granaten berechnet) keimfähig.

In der Tabelle gibt  $t$  die Zeit in Minuten,  $(a - x)$  obs. die Zahl der Kolonien und  $(a - x)$  calc. die nach der Formel

$$\frac{dx}{dt} = K(a - x)$$

berechneten Werte an.  $K$  ist bei jeder Serie unten notiert.

### Tabelle XIII.

Tabelle XV.

45°			35°			25°		
<i>t</i>	( <i>a-x</i> ) obs.	( <i>a-x</i> ) calc.	<i>t</i>	( <i>a-x</i> ) obs.	( <i>a-x</i> ) calc.	<i>t</i>	( <i>a-x</i> ) obs.	( <i>a-x</i> ) calc.
1	1220	1220	1	7750	7750	2	23 400	23 400
2	108	122	2	2440	2451	4	10 940	9 800
3	13	12	4	355	346	8	1 705	1 719
4	5	1.2				14	127	126
<i>K</i> = 1.0			<i>K</i> = 0.5			<i>K</i> = 0.189		

In allen diesen Versuchen findet man eine bedeutende Zunahme der Desinfektionswirkung mit steigender Temperatur. Dieses läßt sich zahlenmäßig folgenderweise ausdrücken:

Die Desinfektionsgeschwindigkeitskonstante, *K*, wird auf das etwa 2.5fache erhöht, wenn die Temperatur um 10 Grade steigt.

Der größte Teil der chemischen und physiologischen Reaktionen wird durch Temperaturerhöhung beschleunigt, für dieses Phänomen hat Arrhenius folgende Formel aufgestellt:

$$\frac{K_1}{K_2} = e^{\frac{\mu}{R} \frac{T_1 - T_2}{T_1 T_2}},$$

wo *K*<sub>1</sub> und *K*<sub>2</sub> die Reaktionsgeschwindigkeiten bei den Temperaturen *T*<sub>1</sub> und *T*<sub>2</sub> angeben. *T*<sub>1</sub> und *T*<sub>2</sub> bedeuten die absolute Temperatur,  $\mu$  ist eine Konstante, und *R* kann man, in Kolonien gleich 2 setzen.

Durch diese Formel kann man mit guter Annäherung das Verhältnis zwischen den aus Tabelle XIII gefundenen Desinfektionskonstanten und den Temperaturen berechnen. Die in dieser Weise für *K* gefundenen Werte sind an der Tabelle XVI unter *K* calc. eingeführt.  $\mu$  wurde gleich 17 890 gefunden.

Tabelle XVI.

## Resumé.

Temperatur	Tabelle XIII		Tabelle XV		Tabelle XIV
	<i>K</i> obs.	<i>K</i> calc.	<i>K</i> obs.	<i>K</i> calc.	<i>K</i> obs.
45°	1.13	1.13	1.0	1.249	
35°	0.47	0.45	0.5	0.5	0.147
—	0.41				
25°	0.171	0.171	0.189	0.189	0.066

$$\mu = 17\,890$$

$$\mu = 14\,820$$

Mit demselben  $\mu$  können auch die Werte der Tabelle XV berechnet werden. Aus den 2 Werten der Tabelle XIV wurde  $\mu = 14820$  gefunden, also etwas kleiner. Zum Vergleich sei angeführt, daß die entsprechenden

Zahlen für die Saponifikation des Äthylacetats 11 160 und für die Rohrzuckerinversion 25 640 Cal. pro Grammmolekül sind.

Daß die benutzten Temperaturen an und für sich keine tötende Einwirkung auf die Sporen hatten, wurde durch besondere Experimente festgestellt.

Tabelle XVII.

20 Granaten werden 5 Minuten in Wasser bei 25° gelassen, gespült, mit Schwefelammonium behandelt, gespült usw., ganz wie nach Sublimat-einwirkung. 3 Min. Ausschüttelung mit 12<sup>ccm</sup> Wasser, das später mit 8<sup>ccm</sup> Wasser versetzt wird. Hiervon werden 5<sup>ccm</sup> auf 800<sup>ccm</sup> verdünnt. Für jede Platte werden 3<sup>ccm</sup> genommen. 20 Granaten werden in ganz derselben Weise bei 35° behandelt.

25°				Mittel	Keimzahl auf 5 Granaten berechnet
479	464	474	464	470	125 335
35°					
474	490	436	488	472	125 868

Während der größte Teil der Versuchsreihen ein ziemlich regelmäßiges Sinken der Kolonienzahl mit der Zeit zeigt, verhalten andere Versuche sich abweichend. So z. B. Tabelle XVIII.

Tabelle XVIII.

Sublimat 256 Liter. Temperatur 35°.

$t$	$(a-x)$	$t$	$(a-x)$
0	179 300	13	491
2	36 300	16	29
4	7 470	20	74
6	3 948	25	86
8	0	30	1 198
10	1 060		

Wenn man von dem abweichenden Resultat für  $t = 8$  Minuten ab-  
sieht, ist es hier auffallend, daß die Kolonienzahl wieder ansteigt, nachdem  
ein Minimum von 29 erreicht wurde. Wir haben ähnliche Phänomene so  
häufig beobachtet, daß wir Versuchsfehler in gewöhnlichem Sinne kaum  
annehmen können. Deswegen werden diese irregulären Resultate hier  
mitgeteilt.

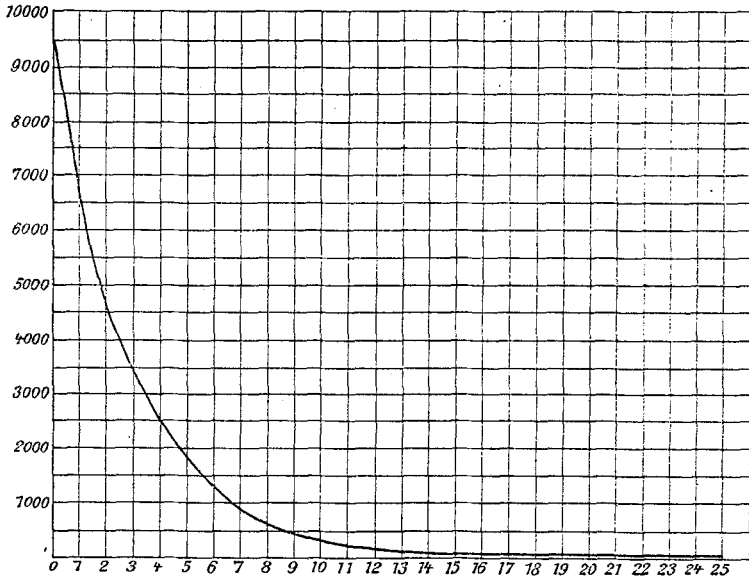
Das Absterben von Milzbrandsporen unter Sublimateinwirkung kann  
man also als eine Reaktion auffassen, die durch eine sehr einfache Formel

$$\frac{dx}{dt} = K(a - x)$$

ausgedrückt werden kann, wo  $K$  die Desinfektions- oder Reaktionsgeschwindigkeit ist.

Sehr ungenau ist das gewöhnlich benutzte Verfahren, die Desinfektionswirkung nach der Zeit zu bezeichnen, da alle Mikroben abgestorben sind. Untersucht man eine größere Anzahl von Experimenten, begegnet man häufig einer ziemlich langen Periode, da „Wachstum“ und „kein Wachstum“ abwechseln, so daß die Bestimmung der Todeszeit mit mehreren Hundert Prozent variieren kann. Dieses wird vielleicht leichter übersichtlich, wenn man die Reaktion graphisch darstellt in einem Koordinatensystem, wo man die Zeit an der Abszissenaxe entlang und die entsprechenden Kolonienzahlen als Ordinaten absetzt.

Untenstehende Kurve ist eine solche graphische Darstellung von dem Versuch an Tabelle XIV.



Die Sporenzahl sinkt einer Kurve entlang, die die Abszissenaxe als Asymptote hat, und theoretisch sollte die Sporenzahl niemals 0 werden, d. h. um eine keimfähige Spore zu bekommen, sind immer größere Flüssigkeitsmengen notwendig. Gewöhnlich wird angegeben, wie viele Keime in 1 <sup>cem</sup> anwesend sind, so daß, wenn nach einer gewissen Zeit 0.25 Spore pro Kubikzentimeter oder 1 Spore in 4 <sup>cem</sup> erreicht ist, man eine Wahrscheinlichkeit von 3 gegen 1 hat, daß eine Plattenkultur aus 1 <sup>cem</sup> Sporenemulsion steril wird. Es ist klar, daß man selbst nach viel längerer Desinfektionszeit noch keimfähige Sporen finden kann. Deswegen

ist die Ungenauigkeit bei der Bestimmung der Todeszeit allein eine sehr große. Durch die hier angegebene Methode wird eine viel größere Genauigkeit erreicht, indem man bei der Berechnung der Desinfektionskonstante  $K$  alle die Bestimmungen berücksichtigt. Geppert hat schon darauf aufmerksam gemacht, daß man aus dem Verhalten der Mikroben während der Desinfektion schließen könnte, daß zwischen einer Anzahl gleichartig zubereiteter Sporen die Resistenz der einzelnen Individuen große Verschiedenheiten aufweist.

Wie die roten Blutkörperchen können Milzbrandsporen als eine Sammlung von Einzelindividuen mit verschiedener Resistenz aufgefaßt werden. Doch wird der größere Teil eine gewisse mittlere Resistenz aufweisen, um welche die Resistenz der anderen Sporen sich gruppiert. Um eine zahlenmäßige Bestimmung von dieser Mittelresistenz zu haben, kann man die Konstante  $K$  aus der oben erwähnten Formel benutzen.

Die Verminderung der Sporenanzahl während der Aufwärmung bei konstanter Temperatur scheint demselben Gesetz zu folgen wie die Sublimatdesinfektion. Als Beispiel kann der Versuch an Tabelle XIX dienen, der in folgender Weise ausgeführt wurde.

In 8 kleinen Glasröhrchen, vorher zu  $110^{\circ}$  gewärmt, wurden in jedes 5 Granaten getan. Danach wurden die Röhrchen in einem Ölbad von  $110^{\circ}$  gehalten. An verschiedenen Zeitpunkten ( $t$ ) wurde ein Röhrchen herausgenommen, schnell abgekühlt und die Sporenmenge in der gewöhnlichen Weise bestimmt.

Tabelle XIX.  
 $110^{\circ}$ .

$t$ (Min.)	$(a-x)$ obs.	$(a-x)$ calc.	$t$ (Min.)	$(a-x)$ obs.	$(a-x)$ calc.
60	3676	5152	180	188	291
90	2304	2512	210	756	142
120	1350	1225	240	77	69
150	696	597	300	10	16

$$K = 0.01$$

Die Bedeutung der Zahlen ist dieselbe wie oben und die Berechnungen sind nach derselben Formel vorgenommen.

Tabelle XX.  
 $99-101^{\circ}$ .

$t$	$(a-x)$ obs.	$(a-x)$ calc.	$t$	$(a-x)$ obs.	$(a-x)$ calc.
60	25 220	23 390	180	1 540	1 831
90	10 860	12 370	210	1 142	969
120	6 725	6 545	240	565	512
150	2 910	3 461	300	412	143

$$K = 0.0092$$



In Tabelle XX findet man einen anderen Versuch bei 100°. Nimmt man in Betracht, daß die Temperatur in diesem Falle beinahe um 2° schwankte, so ist die Übereinstimmung zwischen beobachteten und berechneten Werten eine recht gute.

Die Granaten waren in diesen beiden Versuchen verschieden, so daß sie nicht dazu benutzt werden dürfen, den Einfluß der Temperaturänderungen auf die Reaktionsgeschwindigkeit zu bestimmen.

Wenn Sporen unter Einfluß der Wärme abgetötet werden, spielen vielleicht hydrolytische Prozesse eine Rolle. Man weiß, daß die Desinfektion viel langsamer vor sich geht, wenn das Wasser abwesend ist.

---

Vielleicht wird eine bessere Technik konstante Abweichungen von der hier aufgestellten Formel darlegen. In Anbetracht der großen Versuchsfehler aber, mit denen man noch rechnen muß, gibt sie einen einfachen zahlenmäßigen Ausdruck für den Desinfektionsvorgang.

In ganz analoger Weise, in welcher wir hier die Bedeutung der Temperatur zahlenmäßig bestimmten, kann man auch die Wirkung von anderen Faktoren, Änderungen der Konzentration, des Mediums, Zufügung von organischen Substanzen usw. ausdrücken.

Wahrscheinlich könnte man eine größere Einheitlichkeit erreichen, wenn man den klassischen Desinfektionsmodus, die Einwirkung des Sublimats auf Milzbrandsporen, als Standart aufstellte und damit die Wirkung von anderen Desinfektionsmitteln verglich. Alle anderen Faktoren, Milzbrandsporen, Temperatur, Medium usw. mußten selbstverständlich ganz gleichartig sein, und wegen der kontinuierlichen Änderung der Resistenz der Milzbrandsporen, mußten die Vergleichen gleichzeitig angestellt werden.

Ferner muß erinnert werden, daß die in dieser Weise erreichte Messung der Desinfektionswirkung nur für Milzbrandsporen gültig ist, und daß sie eventuell für andere Mikroben korrigiert werden muß. Ein solches Verfahren verlangt zwar eine sehr bedeutende Arbeit; die Desinfektionslehre würde man aber somit auf eine viel mehr wissenschaftliche Basis als jetzt fußen können.

---