XV.

Der mikroskopische und bakteriologische Nachweis der Mikroorganismen im Wasser.

Zum Nachweis der Bakterien im Wasser und zur Bestimmung ihrer Zahl dienen die mikroskopische Untersuchung und die Cultur in Nährgelatine, welche auf Glasplatten oder in Reagensröhrchen ausgebreitet wird. Um die Art der Mikroorganismen sicher zu erkennen, bedarf man unter Umständen noch einiger anderer Verfahren, nämlich der Stichcultur, der Cultur in Bouillon, in Milch, Nährsalzlösung, Zuckergelatine und Peptonwasser, auf Kartoffeln, auf Agargallerte, auf Fleischbrei, auf Blutserum, der Indolreaction und zuletzt des Thierexperimentes.

A. Verzeichniss der zur mikroskopischen und bakteriologischen Wasseruntersuchung erforderlichen Gegenstände[1]).

a) Für die Entnahme und den Transport.

Sterilisirte Erlenmeyer'sche Kölbchen, Flaschen, oder grössere Reagensgläschen mit Watteverschluss und Gummikappen.

Ein Thermometer.

Eventuell der eine oder der andere der Seite 674 bis 678 angegebenen Apparate zur Entnahme aus mehr oder minder grosser Wassertiefe.

Reagensröhrchen bezw. Ballons mit Spitze oder Hals, zum Zuschmelzen für weiteren Transport.

Ein Gefäss mit Eis, für die Kölbchen, Röhrchen oder Ballons, wenn die Untersuchung nicht sehr bald der Entnahme folgt (S. 679).

Gummirte Etiquetten und Oelstift.

[1]) Die gesperrt gedruckten Gegenstände sind unbedingt erforderlich.

b) Für die mikroskopische Untersuchung.

Ein Mikroskop mit mindestens einem schwachen und einem starken Ocular, einem schwachen Trockensystem und einem System für homogene (Oel-) Immersion, einem Abbeschen Beleuchtungsapparat, mehreren Blenden und dem für die Immersion erforderlichen Oel.

(Das Verhältniss der Oculare und Objective sei derartig, dass Trockensystem und starkes Ocular eine 80- bis 120-fache, Immersionssystem und schwaches Ocular eine ungefähr 500fache Vergrösserung bewirken.)

Gewöhnliche und hohle Objectträger.

Deckgläschen.

Drei Platinnadeln, zwei davon sind 6 cm lange, dünne, in Glasstäbe eingelassene Platindrähte; die dritte wird hergestellt aus einem 0,2 mm starken Platindraht, der in der Flamme möglichst fein ausgezogen, und etwa 1 bis $1^1/_2$ cm lang in einen dünnen Glasstab eingeschmolzen ist (Schiller).

Drei Platinösen, zwei davon sind an der Spitze zu kleinen Oesen umgebogene, in Glasstäbe eingelassene Platindrähte; die dritte, sehr klein, ist hergestellt aus der Spitze der zweiten Hälfte des, wie vorstehend angegeben, ausgezogenen Platindrahtes.

Spitzgläser von 50 bis 100 ccm Inhalt.

Färbeflüssigkeiten in Flaschen mit kleinen Pipetten.

Vaselin bezw. Fett.

Canadabalsam.

Eine Spritzflasche.

Eine Pincette.

Eine Spirituslampe bezw. ein Bunsenbrenner.

Filtrirpapier.

c) Für die Plattencultur.

Rechtwinkelig geschnittene, sterilisirte Glasplatten nicht mehr als doppelt so breit, als die Entfernung von der Säule des Mikroskops bis zur Mitte des Objecttisches beträgt, und 15 bis 20 cm lang.

Petri'sche oder Soyka'sche Doppelschalen von etwa 10 cm Durchmesser.

Sterilisirte 1 ccm-Pipetten mit $^1/_{10}$ ccm-Theilung.

Sterilisirte Glasstäbe.

Röhrchen mit keimfreier, flüssiger, nicht über 40° C. warmer Nährgelatine.

Röhrchen mit keimfreiem, flüssigem, 40° C. warmem Nähragar.

Eine Schale mit Eiswasser, welche, mit Glasscheibe überdeckt, auf einem Nivellirständer steht.

Eine Libelle.

Glasglocken bezw. Teller zur Herrichtung von feuchten Kammern.

Glasbänkchen.

Ein Zählplatte nach Wolffhügel, d. h. eine in Quadratcentimeter getheilte Glasplatte über mattschwarzer Unterlage.

Eine Lupe.

d) Für das Studium der Art der Mikroorganismen.

Reagensröhrchen mit sterilisirter Nährgelatine.

Reagensröhrchen mit sterilisirter Bouillon.

Reagensröhrchen mit Peptonkochsalzwasser verschiedener Concentration.

Reagensröhrchen mit sterilisirter Milch.

Reagensröhrchen mit sterilisirter Lackmusmolke.

U-Röhren, gefüllt mit sterilisirtem Fleischwasser.

Reagensröhrchen mit sterilisirter Agargallerte verschiedener Zusammensetzung.

Reagensröhrchen mit sterilisirtem Blutserum.

Erlenmeyer'sche Kölbchen mit Fleischbrei.

Sterilisirte gekochte Kartoffeln.

Reagensröhrchen mit mineralischer Nährflüssigkeit.

Sterilisirte Messer.

Sterilisirte Pincetten.

Eine sterilisirte Spritze (Morphiumspritze aus Glas mit aufgeschraubten Metallenden, oder Koch'sche Spritze).

Sublimatlösung 1 pro Mille unter Zusatz von 1 Proc. Salzsäure.

Beizen und Farbstoffe für die Cilienfärbung.

Ein Brütapparat, d. h. ein Wärmkasten mit Heizvorrichtung, welche gestattet, die Temperatur der Luft im Inneren des Apparates constant auf 36 bis 38° zu erhalten.

B. Die Vorbereitungen für die Untersuchungen.

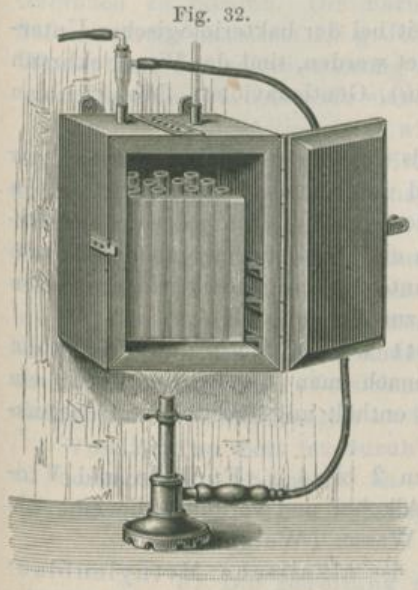
a) Das Sterilisiren der Apparate, Glasgegenstände, Messer etc.

Die Glasgegenstände werden durch Auskochen gereinigt und trocken geputzt oder auf Holzgestellen aufgestellt, bis sämmtliches Wasser abgelaufen ist. Die Reagirröhrchen, die Flaschen und die Erlenmeyer'schen Kölbchen schliesst man durch Bäusche ungeleimter, gewöhnlicher Watte, welche nicht zu fest eingesetzt werden dürfen. Die Glasplatten, die Glasstäbe und die kleinen Pipetten stellt man zweckmässig in passende Blechkästen (Fig. 31), um sie gegen nachträgliche Verunreinigung durch auffallende Keime zu schützen. Die gefüllten Kästen, sowie die Flaschen, Kölbchen, die Petri'schen oder Soyka'schen Schalen, die Injectionsspritze etc. werden in einen Trockenschrank (Fig. 32) mit doppelten Wänden gebracht und $1^1/_2$ bis 2 Stunden auf 150 bis 180° C. erhitzt. In dieser Zeit sind die den Gefässen anhaftenden Keime abgetödtet, bezw. versengt. Man erkennt die genügende Hitzewirkung daran, dass die Watte eine leicht bräunliche Farbe angenommen hat. Sollte sie in einzelnen Gefässen intensiver braun geworden sein, so müssen letztere verworfen werden, da die gebildeten empyreumatischen Producte entwickelungshemmend auf die Bakterien einwirken können.

Fig. 31.

Blechkasten.

Fig. 32.



Trockenschrank.

Die vorstehend erwähnten Glassachen lassen sich auch durch $^3/_4$stündiges Erhitzen im strömenden Wasserdampf sterilisiren. Die Reagensröhrchen werden, nachdem der Wattepfropf etwa 1 cm weit in das Röhrchen hinein-

geschoben ist, mit der Oeffnung nach unten in kleinen Drahtkörbchen in den Sterilisirungsapparat gebracht; um das entstandene Condenswasser zu vertreiben, stellt man die sterilisirten Sachen in den Trockenschrank, wobei die Oeffnungen der Röhrchen nach oben sehen müssen.

Die Spitzgläser und die Glasglocken brauchen nicht sterilisirt zu werden; es genügt, sie in reinem Wasser auszuwaschen und mit einem reinen Tuch auszutrocknen.

Die Deckgläschen (für die Beobachtung im hängenden Tropfen) macht man keimfrei, indem man sie nach vorsichtigem Abwischen langsam durch eine nicht russende Flamme zieht. Die Platinnadeln, Platinösen, die Messer, Pincetten, die Impfnadeln, kurz, die Metallinstrumente, hält man so lange in die Flamme, bis die etwa anhaftenden Keime verbrannt sind (180°). Um eine erneute Infection dieser Gegenstände zu verhüten, werden sie noch heiss so auf die Tischkante gelegt, dass die Klingen und Spitzen die Unterlage nicht berühren, und mit einer Glasglocke überdeckt.

b) Die Anfertigung der Farbstofflösungen.

Die Farbstoffe, welche zur Zeit bei der bakteriologischen Untersuchung am häufigsten angewendet werden, sind das Bismarckbraun (Vesuvin), Fuchsin (Diamantrubin), Gentianaviolett, Methylenblau und Victoriablau.

Bismarckbraun kommt als gesättigte wässerige Lösung zur Verwendung. Die Flasche wird mit einem kleinen Trichter, in welchem das Filter ruht, geschlossen. Für den jedesmaligen Gebrauch werden einige Tropfen in ein Uhrschälchen mit destillirtem Wasser abfiltrirt. Diese verdünnte Lösung, deren Concentration dem Fall angepasst wird, dient zur Färbung (Koch).

Von dem Gentianaviolett werden 2,5 g durch Schütteln in 100 ccm Wasser gelöst, wonach man die Lösung durch ein kleines Filter filtrirt. Das Filtrat enthält ungefähr 2 Proc. Gentianaviolett (Weigert).

Methylenblau löst man zu 2 bis 4 g, Fuchsin und Victoriablau zu 2,0 g in 15 ccm Alkohol und verdünnt die eine wie die andere Lösung mit 85 ccm Wasser (Weigert).

Für viele Mikroorganismen ist alkalische Methylenblaulösung (Löffler) sehr geeignet: 30 ccm concentrirte alkoholische Methylenblaulösung werden mit 100 ccm Kalilauge 1:10000 versetzt.

Intensiv und rasch färbt auch Carbolfuchsin (Ehrlich, Ziehl, Neelsen u. A.). Man bereitet dasselbe, indem man 1 g

Fuchsin in 10 ccm Alkohol löst und die Flüssigkeit mit 100 ccm einer fünfprocentigen Carbollösung versetzt.

Da diese concentrirte Lösung gern Farbstoffniederschläge giebt, so verdünnt man sie zweckmässig zur Hälfte und mehr mit destillirtem Wasser. Die dünne Lösung eignet sich nicht nur für die Färbung von Typhusbacillen, sondern auch für die anderen Bakterien in vorzüglicher Weise.

Empfohlen sei auch das Victoriablau; es färbt die Bakterien rasch und intensiv, Gelatine und Agarreste, die Niederschläge aus Wasser, Bouillon u. s. w. hingegen sehr wenig. Da es leichter verblasst als die anderen Anilinfarben, so eignet es sich für Dauerpräparate weniger gut.

Soll nach der Methode von Gram gefärbt werden, so bereitet man sich eine Lösung von Anilinwassergentianaviolett, indem man ungefähr 5,0 ccm Anilinöl mehrere Minuten lang mit 160 ccm Wasser kräftig schüttelt, 100 ccm des gesättigten Anilinwassers abfiltrirt und 5 ccm einer gesättigten alkoholischen Gentianaviolettlösung hinzufügt. Man thut gut, diese Farbstofflösung ebenso wie die Lösung des Bismarckbraun vor dem jedesmaligen Gebrauch zu filtriren. Die Färbeflüssigkeit hält nur kurze Zeit. Sodann fertigt man aus 1,0 g Jod, 2,0 g Jodkalium und 300 ccm Wasser eine Jodjodkaliumlösung an.

Ueber die Färbetechnik siehe Seite 681 und 691.

Zu den Färbeflüssigkeiten wird zweckmässig etwas Campher (zu 100 ccm ein erbsengrosses Stückchen) gesetzt, wodurch ausser grösserer Haltbarkeit der Lösungen eine bessere Färbung der Mikroorganismen bewirkt wird (Koch). Die Flaschen mit den Farbstofflösungen werden mit durchbohrten Stöpseln verschlossen, welche Pipetten tragen. Man achte darauf, dass die Pipetten nicht bis auf den Boden der Flaschen reichen und dass ein etwa vorhandener Bodensatz auch auf andere Weise nicht aufgerüttelt wird; unter Beachtung dieser Vorsichtsmaassregeln hat man nur selten nöthig, die Farbstofflösungen zu filtriren.

Von Zeit zu Zeit ist durch Anfertigung eines Präparates zu controliren, ob nicht in den Farbeflüssigkeiten selbst Mikroorganismen sich entwickelt haben!

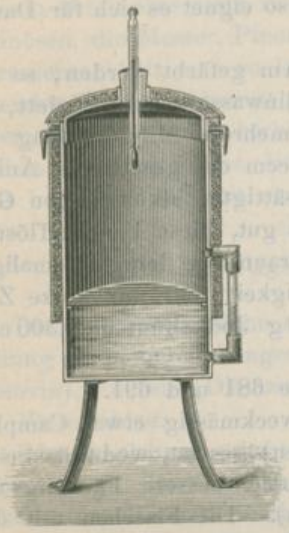
c) Die Bereitung der Nährgelatine.

Man setzt 500 g rohen, gehackten, fettfreien Fleisches mit 1 Liter Wasser an und lässt den Brei in einem kühlen Raume 12 bis 24 Stunden stehen. Die Masse wird auf ein Leintuch ge-

schüttet und gut ausgepresst, wonach man das Filtrat durch Wasserzusatz auf 1 Liter ergänzt. Dann wird $^1/_2$ Stunde im Dampfkochtopf (Fig 33 u. 34) auf 100° C. erhitzt[1]), um den Blutfarbstoff zu zerstören und das Eiweiss, welches sich in dicken Ballen an der Oberfläche der Flüssigkeit ansammelt, zu entfernen.

Bei Zeitmangel kocht man sofort das Gemisch aus Fleisch und Wasser im Dampfsterilisirungsapparate eine bis zwei Stunden und lässt es zur Ausscheidung des Fettes abkühlen.

Fig. 33.



Kleiner Dampfsterilisirungsapparat im Durchschnitt.

Fig. 34.

Grösserer Dampfsterilisirungsapparat.

Die auf die eine oder die andere Weise hergestellte Brühe wird durch ein Faltenfilter besten Filtrirpapiers hindurchgegeben.

Von dem hellen, klaren Filtrat, dem „Fleischwasser", wird ein Theil in ein Kölbchen gefüllt, $^1/_2$ Stunde im Dampftopf sterilisirt, fest verschlossen, etiquettirt und im Dunklen aufgehoben. Der Inhalt dient im Bedarfsfalle zur Füllung der U-Röhrchen bei der Untersuchung auf Typhusbacillen.

In den wiederum zum Kochen erhitzten Rest des Fleischwassers wird $^1/_2$ Proc. Kochsalz, 1 Proc. Pepton (*Peptonum sic-*

[1]) Die Zeit, welche vergeht, bis das Thermometer im Apparate 100° C. zeigt, ist bei allen diesen Zeitbestimmungen selbstverständlich nicht mit gerechnet.

cum[1]) und 10 Proc. Gelatine (die beste für den Hausgebrauch übliche Gelatine) und wenn erwünscht 1 bis 2 Proc. Traubenzucker hinzugegeben. Nachdem alles gelöst ist, wird nochmals kräftig umgeschüttelt. Darauf setzt man unter zeitweiligem kräftigen Schütteln eine gesättigte Lösung von kohlensaurem Natrium so lange hinzu, bis blaues Lackmuspapier nicht mehr geröthet, rothes gerade noch nicht gebläut und violettes (neutrales) nicht verändert wird. Sollte man zu viel Natriumcarbonat angewendet haben, so wird der Ueberschuss durch Zusatz von reiner Salzsäure oder Milchsäure neutralisirt.

Nach genauer Neutralisation, von welcher man sich durch mehrmaliges Proben zu überzeugen hat, fügt man 0,15 Proc. krystallisirtes Natriumcarbonat ($Na_2CO_3 + 10H_2O$) hinzu, d. h. man giebt auf 1 Liter 1,5 g krystallisirte Soda oder 10 ccm von einer 15procentigen Lösung.

Nach Zusatz des Alkalis wird bei 1 Liter Flüssigkeit etwa 20 Minuten, bei 4 Litern etwa 30 Minuten lang gekocht. (Für die Untersuchung auf Cholera eignet sich eine stark alkalische Nährgelatine, welche ungefähr 1 Proc. krystallisirte Soda ($Na_2CO_3 + 10H_2O$), entsprechend 0,37 Proc. wasserfreiem Natriumcarbonat (Na_2CO_3) enthält. Zu ihrer Herstellung setzt man zu 100 ccm der 0,15 Proc. Soda enthaltenden Gelatine 5,5 ccm einer 15procentigen Lösung krystallisirten Natriumcarbonats hinzu und sterilisirt 15 Minuten lang. Eine entstehende Trübung schadet in diesem Falle nicht.) Dann filtrirt man einen Theil der Flüssigkeit heiss durch ein doppeltes Faltenfilter aus bestem Filtrirpapier in sterilisirte Reagensröhrchen, indem man in jedes derselben 7 bis 10 ccm des hellgelben, klaren Filtrates hineinlaufen lässt und darauf achtet, dass, so weit der Wattepfropf reicht, die Nährlösung nicht die Wände des Röhrchens berührt; den Rest filtrirt man in Kölbchen von 100 bis 250 ccm Inhalt. Sollte die Flüssigkeit nicht klar durchlaufen, so filtrirt man sie durch ein reines Tuch in einen Kolben, lässt bis auf ungefähr 40° abkühlen und setzt unter tüchtigem Umrühren das mit der gleichen Menge sterilisirten Wassers kräftig geschüttelte Weisse eines Hühnereies jedem Liter Nährgelatine hinzu. Durch 15 Minuten dauerndes Kochen fällt das Eiweiss aus und schliesst den feinen Niederschlag ein.

Gleich nach dem Ueberfüllen und an dem folgenden Tage werden die gefüllten Reagensröhrchen und die Kölbchen im Dampfsterilisirungsapparate je 15 Minuten lang gekocht und rasch durch

[1]) Am besten erweist sich Pepton sic. Witte-Rostock.

Einsetzen in Wasser abgekühlt. Zu langes Erhitzen raubt der Gelatine die Fähigkeit, zu erstarren. Dieselbe Erscheinung kann eintreten bei zu grosser Alkalescenz.

Durch einmaliges Erhitzen auf 100° werden die in der Nährgelatine befindlichen Bacillen und Kokken sicher getödtet, nicht so sicher alle Sporen. Bei dem vorstehend beschriebenen Verfahren wird den letzteren indessen Zeit gegeben, auszukeimen und zu Bacillen auszuwachsen. Das Aufkochen am zweiten Tage zerstört dann die im Laufe des ersten Tages aus den Sporen entstandenen Bacillen. Der sterilisirte Nährstoff wird, sofern er nicht alsbald verwendet werden soll, vor dem Austrocknen geschützt, indem man die oberen Enden der mit Wattepfropfen verschlossenen Röhrchen mit passenden Gummikappen versieht. Da hier und da sich in der Gelatine sehr schwer zerstörbare Sporen finden, so ist die Nährgelatine in den ersten Tagen täglich zu besichtigen, ob sich nicht etwa Colonien darin gebildet haben. Die inficirten Röhrchen sind auszumerzen und abermals an zwei auf einander folgenden Tagen zu sterilisiren.

d) Die Bereitung sterilisirter Bouillon.

Man fertigt dieselbe in der Weise an, dass man von der Fleischflüssigkeit, welche zur Herstellung der Nährgelatine dient, nachdem man Kochsalz und Pepton, aber noch keine Gelatine hinzugesetzt hat, 50 ccm in ein kleines Kölbchen abgiesst, für sich neutralisirt, circa 0,15 Proc. Soda zugiebt, kocht, filtrirt, in Röhrchen vertheilt, sofort und am folgenden Tage sterilisirt.

Die Bereitung des Fleischwassers für die U-Röhrchen ist auf Seite 656 angegeben.

e) Die Bereitung der Agar-Agar-Nährgallerte.

Die Nährgelatine hat den Nachtheil, bei Temperaturen, welche über 23° C. liegen, sich zu verflüssigen. Dahingegen besitzt das Agar-Agar die Fähigkeit, noch bei 40° C. fest zu bleiben. Bei Culturen, welche die Temperatur des Blutes zu ihrer Entwickelung oder zu ihrem besseren Fortkommen verlangen, gebraucht man daher einen Nährboden, in welchem die Gelatine durch 1 Proc. Agar-Agar ersetzt ist.

Bei der Bereitung verfahre man folgendermaassen:

Man macht das Fleischwasser schwach alkalisch, erwärmt auf 100° und giebt unter langsamem Umrühren das fein zerzupfte

Agar-Agar (0,75 bis 1,5 Proc.) hinein. Dasselbe quillt in der heissen Flüssigkeit rasch auf. Dann kocht man drei bis vier Stunden im Dampfapparate, prüft hierauf die Reaction und macht, wenn nöthig, schwach alkalisch. Nun wird das Gemenge wieder so lange in den Dampfapparat gestellt, bis der obere Theil der Flüssigkeit klar ist (je nach der Menge kann dies noch 12 Stunden und mehr dauern). Dann giebt man hinein: Pepton sicc. alb. 1,0 Proc., Kochsalz 0,5 Proc., Gelatine 2,0 Proc., löst unter tüchtigem Umrühren, macht die Lösung schwach alkalisch und kocht eine Stunde im strömenden Dampf, in welcher Zeit die Flüssigkeit klar geworden ist. Man filtrirt zunächst durch ein weitmaschiges Tuch, dann nochmals durch ein doppeltes Faltenfilter in Reagircylinder und kleine Kölbchen.

Das filtrirte Agar wird zweimal je $^1/_2$ Stunde lang sterilisirt.

Will man das Fleischwasserpeptonagar benutzen, so muss man dasselbe vorher verflüssigen, was erst bei ungefähr 100° gelingt. Man lässt dann bis auf höchstens 40° abkühlen, impft und giesst auf Platten aus. Das Agar-Agar hat die unangenehme Eigenschaft, Wasser auszuscheiden, wesshalb es an der Oberfläche feucht ist und leicht von der Platte abgleitet. Für Culturen eignen sich daher am besten flache Schalen (Soyka, Petri). Das Abgleiten kann man übrigens auch durch Siegellack verhindern, welchen man auf den Rand der Glasplatten träufelt.

Zur Herstellung sogenannter „hoher Röhrchen" füllt man 12 bis 15 ccm des Nähragars in die Reagirröhrchen hinein.

Die „schrägen Röhrchen" werden in der Weise hergestellt, dass man den Inhalt der Röhrchen — etwa 6 ccm Nähragar — verflüssigt und in schräger Lage der Röhrchen erstarren lässt.

f) Die Bereitung von Fleischbrei.

In Erlenmeyer'schen Kölbchen wird der Boden mit einer 2 cm hohen Schicht fettfreien, gehackten Fleisches bedeckt, und so viel Wasser zugegeben, dass das Fleisch noch herausragt. Die Masse wird an drei hinter einander folgenden Tagen in den Kölbchen sterilisirt. — Der Fleischbrei findet nur bei der Untersuchung auf Typhusbacillen Verwendung.

g) Die Bereitung von Peptonkochsalzwasser.

600 ccm destillirten Wassers werden mit 0,5 g Kochsalz versetzt und $^1/_2$ Stunde gekocht. In die heisse Flüssigkeit werden

5 g Pepton gegeben, wenn man das Peptonkochsalzwasser zur Untersuchung auf Cholera, aber 15 g, wenn man es zum Nachweis des Typhus verwenden will. Sobald sich das Pepton gelöst hat, wird filtrirt und das Filtrat zum Theil in Reagirröhrchen gefüllt, welche ebenso, wie der im Kolben verbliebene Rest, 15 Minuten auf 100° erhitzt werden.

Anmerkung. Das Pepton soll weiss, geruchlos, im warmen Wasser völlig löslich sein; seine Lösung muss klar und farblos aussehen, neutral oder schwach alkalisch reagiren, mit Fehling'scher Lösung eine durch Kochen unveränderliche violette Färbung, aber keinen röthlichen oder grünlichen Farbenton annehmen (bei Anwesenheit von Zucker wird kein Indol gebildet), sich bei Anwendung des Griess'schen Reagens nitritfrei zeigen und mit dem Diphenylreagens nach etwa fünf Minuten einen zwar schwachen, aber deutlich sichtbaren, schmalen, hellblauen Ring geben (Gorini, Centralblatt f. Bakt. 1893, S. 790).

h) Die Herstellung sterilisirter Milch.

Milch ist durch blosses Kochen schwer zu sterilisiren, es bedarf entweder des häufigen oder des sehr lange fortgesetzten Kochens; in beiden Fällen wird die Milch braun und in ihrer Gerinnungsfähigkeit etwas beschränkt. Kirchner hat nachgewiesen, dass das Chloroform die meisten der in der Milch enthaltenen Bakterien tödtet. Es sei daher ein combinirtes Verfahren empfohlen. 100 ccm frisch in ein sterilisirtes Gefäss gemolkener Milch werden sofort in einen sterilisirten Kolben geschüttet, dann werden 2,0 ccm Chloroform zugesetzt; der Kolben wird durch einen Gummipfropfen fest geschlossen und geschüttelt. Die Milch bleibt mehrere Tage mit dem Ueberschuss von Chloroform stehen, wird darauf in sterilisirte Reagenscylinder gefüllt, die wie üblich mit Wattepfropfen lose geschlossen sind, und an zwei aufeinander folgenden Tagen je $^1/_2$ Stunde sterilisirt. Die so behandelten Röhrchen kommen in den Brütapparat; diejenigen, deren Inhalt nach 48 Stunden geronnen ist, werden ausgeschieden, die übrigen werden fest verschlossen zum Gebrauch aufgehoben.

i) Die Herstellung der Nährsalzlösung.

Traubenzucker 20,0 g, Kalium- oder Natriumnitrat 10,0 g, Dikaliumphosphat 1,0 g, Magnesiumphosphat 2,0 g, Chlorcalcium 1,0 g werden in 1000 ccm destillirten Wassers gelöst und die Lösung an zwei aufeinander folgenden Tagen aufgekocht. Dient nur zur Differentialdiagnose bei der Untersuchung auf Typhusbacillen.

k) Das Präpariren der Kartoffeln zu Nährböden.

Manche Mikroorganismen wachsen auf durchschnittenen, gekochten Kartoffeln in charakteristischer Weise. Zum Anlegen von Culturen eignen sich die nicht mehligen Arten, die Futter- oder Salatkartoffeln am besten. Die Haut derselben sei möglichst glatt. Sind sogenannte Augen vorhanden, so werden dieselben ausgestochen. Die Kartoffeln reinigt man alsdann gründlich mit Bürste und Wasser, legt sie eine Stunde lang in eine Sublimatlösung von 5:1000 und lässt sie danach während 30 Minuten in einem Blechgefässe mit durchbrochenem Boden in dem Dampfsterilisirungsapparate kochen, wodurch sie keimfrei werden. Während dieser Zeit wird eine feuchte Kammer bereitet, indem man eine Glasglocke mit einpromilliger saurer Sublimatlösung auswäscht, die Sublimatlösung wieder abgiesst, die Glocke mit sterilisirtem Wasser vom Sublimat befreit und auf ihren Boden eine mit frisch abgekochtem Wasser befeuchtete Scheibe Filtrirpapier legt. Für jede Kartoffel wird ein gewöhnliches Küchenmesser durch starkes Erhitzen sterilisirt.

Ist alles vorbereitet, so wäscht man sich die Hände mit Sublimatlösung, erfasst mit Zeigefinger und Daumen der linken Hand die Kartoffel und durchschneidet sie mit dem sterilisirten Messer. Dann legt man die beiden auseinander geklappten Hälften mit der Schnittfläche nach oben in die Schale und schliesst letztere sofort durch die übergestülpte Glockenhälfte. Bei diesem Verfahren ist darauf zu achten, dass die Schnittfläche der Kartoffel und der Schnittrand einzig und allein mit dem sterilen Messer, dagegen durchaus nicht mit den Fingern oder den Fingernägeln in Berührung komme.

E. v. Esmarch schlägt eine andere Art der Bereitung der Kartoffeln vor, welche sich bewährt hat. Man wäscht die Kartoffeln ab, schält sie mit einem Küchenmesser, schneidet sie in Scheiben, deren Grösse sich nach dem Rauminhalt kleiner Doppelschälchen richtet und spült dann die passend geschnittenen Scheiben in reinem Wasser ab. Nachdem die Kartoffelstückchen in die Glasgefässe gelegt sind, werden sie ungefähr eine Stunde lang in den Dampfsterilisirungsapparat gebracht. Derartig präparirte Kartoffeln bleiben wochenlang brauchbar. Die obere Schale schützt genügend vor verunreinigenden Keimen, welche aus der Luft hineinfallen können. Die gläsernen Doppelschälchen sind ungefähr $1^1/_2$ cm hoch und haben einen Durchmesser von 5 bis 6 cm. Noch besser ist es, die Kartoffeln zuerst zu kochen, dann auszuschneiden, die Scheiben in die sterilisirten Schälchen zu legen und sie darauf

$^1/_4$ Stunde lang in den Dampfapparat zu bringen. Die Oberfläche der Kartoffelstücke bleibt unter dieser Bedingung weicher als bei dem Beschicken der Schälchen mit ungekochten Kartoffeln.

Globig schneidet aus gekochten Kartoffeln längliche Stücke, schiebt diese in gewöhnliche Reagirröhrchen, verschliesst mit Watte und sterilisirt kurze Zeit im Dampfkochtopf. Auch diese sehr einfache Methode ist recht brauchbar.

Der Typhusbacillus wächst charakteristischer und besser auf den nach der ersten Methode in grosse Glocken gelegten Kartoffeln. Kocht man die Kartoffeln in 2 bis 4proc. Kochsalzlösung (Fischer), so wachsen auch die Cholerabacillen darauf.

1) Die Bereitung eines festen durchsichtigen Nährbodens aus Blutserum.

Koch benutzte zuerst das Blutserum als Nährboden; es gelang ihm auf demselben bei Brüttemperatur die Züchtung mancher Organismen, welche auf Fleischwasserpeptongelatine oder Agar-Agar nicht zum Wachsthum zu bringen waren.

Die Bereitung sterilen Blutserums erfordert besondere Aufmerksamkeit; man muss sich dabei bemühen, ähnlich wie bei der Milch, von vornherein möglichst alle Keime auszuschliessen.

Dem zu schlachtenden Thiere werden, wenn angängig, die Haare am Halse abgeschnitten, worauf man die geschorene Stelle mit Sublimatlösung abwäscht und mit abgekochtem Wasser abspült. Ist das nicht thunlich, so trennt man die Haut in der Medianlinie so weit ab, dass sie bequem zur Seite gezogen werden kann. Nach Eröffnung der Halsschlagadern lässt man vorerst einiges Blut fortströmen und fängt alsdann das Blut in vorher mit 1 pro Mille Sublimatlösung ausgewaschenen, mit sterilisirtem Wasser nachgespülten, mit Alkohol und Aether gereinigten hohen Gläsern auf.

Die Gläser lässt man etwa 24 Stunden im Eisschrank stehen, ohne sie zu bewegen. Nach Ablauf dieser Zeit wird das klare, gelbliche Serum zu je 5 bis 8 ccm mit sterilisirten Pipetten in sterilisirte Reagensgläschen vertheilt.

Die Pfropfen der Röhrchen sind so zwischen den Fingern zu halten, dass nur der aus dem Röhrchen hervorragende Theil gefasst wird, und dass der den eigentlichen Verschluss bildende Theil des Wattepfropfens mit den Fingern unter keinen Umständen in Berührung kommt.

Würde man das Serum kochen, um es zu sterilisiren, so würde es in Folge der Gerinnung undurchsichtig. Dagegen er-

starrt das Blutserum bei 65 bis 72°, ohne seine Durchsichtigkeit zu verlieren.

Man tödtet daher die Keime durch discontinuirliche Erwärmung. Mindestens vier Tage lang werden die Serumröhrchen täglich acht Stunden und länger auf 68 Grad erhitzt. Es geschieht das in Apparaten von der durch Fig. 35 erläuterten Construction. Der Raum zwischen den Doppelwandungen des Kastens wird mit Paraffinöl oder Wasser angefüllt. Man wendet ersteres lieber als Wasser an, um das Rosten zu verhüten. Die Röhrchen werden schräg in den Apparat gelegt, damit das erstarrende Blutserum eine möglichst grosse Oberfläche erhalte.

Fig. 35.

Apparat zum Sterilisiren und Erstarren von Blutserum.

Die Temperatur soll nicht über 70° hinausgehen, weil sonst die Durchsichtigkeit leidet.

Die zur Erstarrung erforderliche Zeit schwankt zwischen einer halben und mehreren Stunden. Je niedriger die Temperatur ist, bei welcher die Erstarrung eintritt, um so mehr Zeit ist erforderlich, um so klarer aber wird auch das Präparat. Am schnellsten erstarrt Hammelserum, am langsamsten Kälberserum. Während des Festwerdens rühre man die Röhrchen nicht; öfteres Bewegen verhindert den Gelatinirungsprocess. Die fertigen Gläschen stellt man für drei Tage in den Brütapparat, um eventuell lebendig gebliebene Keime zur Entwickelung zu bringen. Die Röhrchen mit nicht sterilem Inhalt werden ausgeschieden.

Das sich beim Gelatiniren abscheidende Wasser darf nicht ausgegossen werden, weil das Serum sonst zu rasch austrocknet. Um die Serumröhrchen Monate hindurch frisch zu erhalten, schliesst man sie mit gut passenden Gummikappen, die dick mit Lanolin bestrichen sind. Lanolin ist für Bakterien und Schimmel undurchdringlich.

Die Impfung erfolgt durch Verstreichen des Impfmaterials mittelst einer Platinöse auf der schrägen Oberfläche des Blutserums.

m) Die Herstellung der Lackmusmolke[1]).

Ganz frische Milch wird mit der gleichen Menge Wasser versetzt, der so viel Salzsäure zugesetzt ist, als für die Ausfällung des Caseïns genügt. Der Caseïnniederschlag wird abfiltrirt. Das Filtrat wird nun genau neutralisirt (nicht bis zu eintretender Alkalescenz!), dann eine bis zwei Stunden im Dampfkochtopf gekocht, wobei der Rest des Caseïns ausfällt, und filtrirt. Ist die Molke alkalisch gemacht worden, so wird sie durch das Kochen braun oder gelbbraun und ist für Farbenreactionen nicht mehr verwendbar. Bleibt die Molke nach dem Filtriren trübe, so sterilisirt man sie, lässt den trüben Niederschlag sich absetzen und hebert die klare Flüssigkeit ab. Die völlig wasserhelle, mit einem Stich ins Gelbgrünliche versehene, genau neutrale Molke wird im Dampfkochtopf sterilisirt und zum Gebrauch aufgehoben.

Daneben wird gesondert und steril aufgehoben empfindliche Lackmuslösung (S. 383, 1.) von einer solchen Concentration, dass etwa 5 ccm zur Färbung von 100 ccm Molke genügen.

Die durch Zusammenschütten kleiner Proben erlangte Flüssigkeit darf empfindliches Lackmuspapier nicht färben und muss einen schönen, neutral-violetten — im Sinne der Optik purpurnen — Farbenton haben.

n) Die Herstellung der feuchten Kammer.

Als „feuchte Kammer“ dient der abgeschlossene Raum, welchen man erhält, wenn man eine Glasglocke in eine grössere Glasschale stellt. Untersatz und Glasglocke werden mit reinem Wasser oder verdünnter Sublimatlösung sorgfältig abgespült und sodann mit einem reinen Tuche gut abgetrocknet. Auf den Boden der unteren Schale legt man eine doppelte, fast den ganzen Boden einnehmende Scheibe von Filtrirpapier und befeuchtet sie mit Wasser. Sodann setzt man auf das Papier ein Glasbänkchen, welches man herstellt, indem man eine Glasplatte von ungefähr 4 cm Breite und 15 cm Länge mittelst Siegellack auf zwei ungefähr 1 cm hohe Glasleisten kittet. Auf das Bänkchen wird ein Stückchen Filtrirpapier gelegt, welches die Unterlage nach keiner Seite hin überragen darf. Das Papier dient dazu, die aufgelegte Versuchsplatte am Abgleiten zu hindern und die zu der

[1]) Petruschky, Bakteriologisch-chemische Untersuchungen. Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde 6, 657.

betreffenden Platte gehörige Notiz aufzunehmen. — Man kann mehrere Glasbänkchen nebst den zugehörigen Versuchsplatten in eine Glocke bringen, wobei als Regel gilt, dass die an Keimen vermuthlich reichhaltigste Platte zu unterst gesetzt wird.

Glasbänkchen, Papier, Wasser und Glocke brauchen nur rein, nicht aber steril zu sein, da sie mit der Nährgelatine nicht in directe Berührung kommen.

o) Behelfe.

Im Folgenden soll kurz erläutert werden, wie man sich helfen kann, wenn die beschriebenen Geräthe u. s. w. in wünschenswerther Vollständigkeit nicht zur Verfügung stehen.

Fehlt ein Trockenschrank, so sterilisirt man die Glassachen direct über einer nicht russenden Flamme. Die Wattepfropfen schiebt man vorher 1 cm tief in die betreffenden Gefässe hinein, damit die Flamme sie nicht ansengt.

Das Erhitzen muss bis zur Abtödtung der Keime getrieben werden. An der Stelle, wo der Wattepfropfen sitzt, zeigt eine leichte Bräunung desselben den erforderlichen Hitzegrad an. Stark angesengte Watte macht das Gläschen unbrauchbar. Es ist dafür Sorge zu tragen, dass die über der freien Flamme zu sterilisirenden Kolben, Pipetten, Röhrchen u. s. w. vollständig lufttrocken sind. Die übrigen Glassachen lassen sich ebenfalls über der freien Flamme keimfrei machen. Die Glasplatten bedürfen, wenn sie vorher sorgfältig abgewaschen und mit einem reinen Tuche polirt wurden, zur Sterilisirung nur kurz dauernder Erhitzung der einen Seite (Abflammen); sie werden bis zum Gebrauch zur Abkühlung mit der abgeflammten Seite nach oben einzeln unter Glasglocken, oder zu zweien mit den sterilen Flächen aufeinander gelegt.

Der Trockenschrank lässt sich auch durch den Bratofen der Küche ersetzen; die leichte Bräunung der Watte, welche innerhalb von ein bis zwei Stunden eintritt und angiebt, dass der Hitzegrad für die Sterilisation genügend war, ist abzuwarten.

Eine geeignete Nährgelatine kann man sich herstellen durch Auflösen von 1 Theil Liebig'schen Fleischextractes, 1 Theil Pepton und 10 Theilen Gelatine ohne Zusatz von Kochsalz, welches sich in dem Fleischextract in genügender Menge vorfindet, in 100 Theilen Wasser, oder durch Auflösen von 2,5 Theilen Fleischpepton (z. B. Kemmerich's) und 10 Theilen Gelatine in 100 Theilen Wasser. Hueppe räth, diesen Lösungen, um sie allgemeiner brauchbar zu machen, Trauben- oder Rohrzucker ($^1/_2$ bis 2 Proc.) hinzuzusetzen, welchem Vorschlage wir beipflichten.

Die Bouillon lässt sich ebenfalls mit Hülfe von Fleischextract bezw. Fleischpepton bereiten.

Steht ein Dampfsterilisirungsapparat, dessen Anwendung übrigens seiner sicheren Wirkung wegen immer zu empfehlen ist, nicht zur Verfügung, so erhitze man die Nährflüssigkeit im Wasserbade, welchem zweckmässig Kochsalz oder Chlorcalcium zur Erhöhung des Siedepunktes hinzugesetzt wird. Das Aufkochen behufs Sterilisation kann in derselben Weise bewerkstelligt werden. Wenn die Röhrchen 15 Minuten in dem lebhaft kochenden Wasser gestanden haben, nehme man sie heraus und wische sie ab. Auch lassen sich die gefüllten Reagensgläschen durch kurzes Aufkochen über der freien Flamme sterilisiren.

Ein Dampfkochtopf lässt sich improvisiren durch einen vom Klempner gefertigten Cylinder von Weissblech von etwa 20 bis 25 cm Durchmesser, der oben einen Deckel trägt, durch dessen Undichtigkeiten die Wasserdämpfe schon genügend entweichen, und dessen Boden durchlöchert ist. In 6 cm Höhe von unten her ist aussen ein Blechring angelöthet, welcher dem Rande eines Kochtopfes der Herdfeuerung aufruht. Der Kochtopf wird mit Wasser gefüllt, das Herdfeuer entzündet; der Cylinder wird durch den aufsteigenden Dampf bald in seinem Inneren auf Siedetemperatur gebracht.

Ein Brütapparat einfachster Construction wird von Esmarch empfohlen. Auf den Boden eines grossen und hohen Kochtopfes wird ein Stück Filz oder Pappe gelegt, und darauf ein Becherglas gestellt, welches durch eingelegtes Blei oder durch Sand genügend beschwert ist. Der Kochtopf wird mit Wasser von 40° C. bis beinahe zum Rande des Becherglases gefüllt und durch ein Nachtlicht oder eine kleine Petroleumlampe auf einer Temperatur von 30 bis 37° C. gehalten. Als Verschluss dient ein Holzdeckel, welcher noch mit einer Watteschicht bedeckt wird.

Den Zählapparat kann man dadurch ersetzen, dass man auf ein Stück schwarzen Papieres mit weisser Farbe feine Linien in 1 cm Abstand zieht, die sich rechtwinkelig kreuzen. Die zu zählende Platte wird auf das Papier gelegt.

Die Bereitung des schräg erstarrten Blutserums lässt sich dadurch bedeutend abkürzen, dass man das möglichst sorgfältig eingefüllte und behandelte, sofort bei 65 bis 70° C. erstarrte Blutserum nur an einem Tage während 8 bis 12 Stunden auf dieser Temperatur hält und dann die Röhrchen gleich in den Brütapparat bringt. Innerhalb der nächsten zwei bis drei Tage werden sich in den Gläschen, welche Keime enthielten, Colonien

entwickelt haben. Diese Röhrchen sind auszuscheiden. Nur diejenigen, welche keine Keimentwickelung zeigen, sind brauchbar.

Die feuchte Kammer kann man durch zwei auf einander gedeckte Teller ersetzen. Hierbei sind die Glasbänkchen entbehrlich, weil die Platten mit den Ecken dem Tellerrande aufliegen. Da die Teller weniger dicht schliessen, als die Glocken, so verdunstet einerseits die Feuchtigkeit schneller und andererseits können leichter fremde Keime in den Raum zwischen den beiden Tellern gerathen. Man muss daher eine dickere Unterlage nassen Filtrirpapiers anwenden, den Apparat an einem möglichst staubfreien, vor Luftzug geschützten Orte aufstellen und eventuell, um das Eindringen von Fliegen zu verhüten, eine Gazeumhüllung anbringen oder ein feuchtes Tuch herumlegen.

Hat man zur Entnahme von Wasserproben Erlenmeyer'sche Kölbchen oder sterilisirte Reagensröhrchen nicht zur Hand, so koche man eine gewöhnliche Medicinflasche aus, spüle sie wiederholt mit dem zu prüfenden Wasser, fülle dieselbe und verschliesse sie mit einem Stopfen, welchen man mit einem durch Hitze sterilisirten Messer aus einem grossen Korke heraus geschnitten und ebenfalls gekocht hat, oder besser noch, aus einem frischen Zweige unter Entfernung der Rinde mit einem abgeflammten Messer geschnitten hat. Die Untersuchung derartig entnommener Wasserproben muss baldmöglichst geschehen.

Besitzt man keinen mit Eis gefüllten Nivellirständer, so legt man die Platten nach Unterlage eines Blattes Papier auf einen horizontal stehenden Tisch, giesst aber die geimpfte Gelatine erst aus den Röhrchen auf die Platte, wenn sie beginnt, dickflüssig zu werden.

C. Die Ausführung der Untersuchung.

a) Die Entnahme von Wasserproben.

Die richtige Entnahme der Wasserproben ist der wichtigste Theil der ganzen bakteriologisch-mikroskopischen Wasseruntersuchung, sie ist die „conditio sine qua non". Leider wird aber, wie uns die Erfahrung gelehrt hat, nirgends in dem ganzen Verfahren der Wasseruntersuchung so viel gefehlt, als in diesem Punkte; es sei ihm daher eine ausführliche Besprechung gewidmet.

Die mikroskopische Untersuchung verfolgt den Zweck, gröbere Elemente, Fäcalreste, Abfälle aus Küche und Wirthschaft etc. im Wasser nachzuweisen. Diese Körper sind im Allgemeinen schwerer als das Wasser, werden sich also am Boden finden. Die Untersuchung des Bodensatzes, des Schlammes und

nicht die des freien Wassers giebt daher gewöhnlich die Antwort auf die gestellte Frage. Meistens kommt es darauf an, die oberste Schlammschicht zu erhalten, die man entweder nach Ablassen des Wassers direct abschöpft, oder bei nicht abgesenktem Wasserspiegel mit einem Schöpfgefässe entnimmt, nachdem die Wassertiefe vorher genau bestimmt worden ist. Hat man Zeit, so hängt man weite Glasschalen (die Hälfte einer „feuchten Kammer") in dem fraglichen Wasser dicht über dem Grunde auf und hebt sie nach einiger Zeit wieder heraus. Ist weniger Zeit vorhanden, so kann man bei geringer Tiefe die Schale vorsichtig in den Schlamm hineinsenken und die oberste Schlammschicht über den Rand langsam hineindringen lassen. Ferner lässt sich durch energische Bewegung des Wassers die oberste Schlammlage aufrühren und das mit Schlammtheilchen durchsetzte Wasser schöpfen und sedimentiren oder filtriren. In laufenden Wässern spannt man Filtertücher auf, in welchen sich der Schlamm absetzt.

Die bakteriologische Untersuchung soll, sofern nicht nach Krankheitserregern gesucht wird oder besondere Fragen beantwortet werden müssen, Aufschluss geben über die Zulänglichkeit der künstlichen oder natürlichen Filtration. Gewöhnlich muss also die Probeentnahme so stattfinden, dass die accessorischen Keime vermieden werden.

Will man die Leistung eines Sandfilters prüfen, so ist sein Rohwasser und sein Reinwasser zu untersuchen. Man schöpft daher die Probe für ersteres nicht aus irgend einer bequem zu erreichenden Stelle des Flusses, Sees oder Klär- bezw. Absitzbeckens, sondern direct vor den Saugern, und zwar auch dann, wenn die Probeentnahme dort etwas beschwerlicher und umständlicher ist, man z. B. das Wasser aus grösserer Tiefe heraufholen muss. In entsprechender Weise ist die Probe des filtrirten Wassers zu entnehmen; sie wird also nicht an einer beliebigen Stelle des Reinwasserreservoirs geschöpft, sondern möglichst dicht hinter den einzelnen Filtern aus dem Reinwasserrohre, welches zum Reservoir hinführt. Von Kümmel und Reinsch[1]) ist eine Methode angegeben, um die abführenden Rohre älterer Filter, die sonst nicht zugängig sind, der Probeentnahme zugängig zu machen.

Soll genau der Bakteriengehalt des Rohwassers mit dem seines Reinwassers verglichen werden, so ist das letztere um so viel später zu untersuchen, als das Rohwasser gebraucht, um sich

[1]) Reinsch, Ueber die Entnahme von Wasserproben behufs bakteriologischer Untersuchung bei den Sandfiltern älterer Construction. Centralbl. f. Bakteriologie u. Parasitenkunde 14, 278.

in Reinwasser zu verwandeln und bis zur Stelle der Probeentnahme vorzudringen.

Will man wissen, wie bakterienhaltig das Wasser ist, welches in die Stadt geliefert wird, so ist die Probe vor dem Reinwassersauger, oder aus dem Windkessel, oder einem anderen geeigneten Orte des primären Rohrstranges zu entnehmen. Kommt es darauf an, die Bakterien in dem zur Vertheilung dienenden Rohrnetze zu bestimmen, so schöpft man die Probe nicht aus einem selten benutzten Hahn eines oberen Stockwerkes, sondern aus demjenigen Zapfhahn, welcher das meiste Wasser abgiebt, weil man bei ihm die Additionalkeime der Stagnation vermeidet, und die Bakterien im Hahn selbst keine Zeit zur Ansiedelung und Entwickelung haben. Schöpft man aus einem gewöhnlichen, nicht viel gebrauchten, nicht kühl gelegenen Zapfhahn, so genügt es nicht, das Wasser 10 Minuten oder einige Stunden hindurch ablaufen zu lassen, bevor man zur Prüfung Wasser entnimmt; der Hahn muss vielmehr gründlich mechanisch gereinigt und zugleich desinficirt werden, ferner ist eine event. vorhandene Leder- oder Gummiplatte zu entfernen, ihr Lager zu desinficiren und eine gehörig desinficirte und in sterilisirtem Wasser vom Desinfectionsmittel befreite neue Platte einzulegen. Ist Dieses oder Aehnliches geschehen, dann erst lässt man das Wasser längere Zeit ablaufen. Der Zapfhahn sei mit einem möglichst kurzen Rohrstück mit dem Strassenrohre verbunden.

Wird die Frage nach dem Keimgehalt einer Quelle gestellt, so schöpfe man nicht aus der Brunnenstube, sondern man suche die Quelle dort zu erreichen, wo sie aus dem Erdreiche, dem Gestein zu Tage tritt. Quillt sie unter Wasser hervor, so ist das vordringende Wasser unvermischt von dem umgebenden Wasser zu entnehmen. Man muss sich ferner hüten, bei der Entnahme das Erdreich oder Gestein zu berühren, damit nicht von dorther Bakterien losgerissen und in die Probe gespült werden. Nicht alle Quellen führen, wie früher gezeigt worden ist, keimfreies Wasser; die Untersuchung der Quellen hat also volle Berechtigung.

Aehnlich steht es mit der Untersuchung der Brunnen. Das Grundwasser ist ja im Allgemeinen von einer gewissen Tiefe an keimfrei; im einzelnen Falle kommt es aber darauf an, nachzuweisen, dass diese Annahme auch richtig ist. Nicht selten z. B. liegen Centralbrunnen dicht neben Flüssen; die physikalische und chemische Untersuchung lässt die Frage offen, ob Grund- oder Flusswasser geschöpft wird, oder weist nach, dass bald Flusswasser, bald Grundwasser gehoben wird, oder zeigt con-

stant Flusswasser oder Mischwasser an; dann muss entschieden werden, ob in einem solchen Falle das Wasser, also eventuell filtrirtes Flusswasser, keimfrei ist oder nicht, denn im ersteren Falle kann das Wasser wohl, im zweiten hingegen möglicherweise nicht zum Consum zugelassen werden.

Um die Frage nach dem Keimgehalt derartiger oder ähnlicher Brunnen zu entscheiden, ist erforderlich, dass der Brunnen in solcher Weise längere Zeit hindurch abgepumpt wird, wie er beim normalen Betriebe benutzt wird. Zuweilen kommt man schon zum Ziele, wenn man nach längerem Betriebe das Wasser aus dem nächsten, zugängigen Auslaufe entnimmt. Finden sich in einem solchen Falle keine oder sehr wenig Keime, so ist die genügende Filtrationsleistung erwiesen, finden sich indessen viele Keime, so bleibt der Einwand bestehen, die Bakterien seien auf dem Wege vom Austritt aus dem Erdreiche bis zur Entnahmestelle in das Wasser hineingelangt. Man kann auch das Wasser direct aus dem Brunnen dicht neben und unter dem Saugkorbe der Pumpe entnehmen in der Annahme, dass sich an dieser Stelle zudringendes Grundwasser auf dem Wege zur Pumpe befinde. Hierbei sind dann sowohl die nicht in Betracht kommenden zahlreichen Bakterien der oberen Wasserschichten, als auch die Bakterien des „Bodenschlammes" zu vermeiden. Man muss also den Abstand des Saugkorbes von der Erdoberfläche und vom Brunnenboden vorher genau bestimmen. Indessen trifft die Annahme, dass sich Bakterien aus den oberen Wasserschichten und dem Brunnenschlamm dem zuströmendem Wasser nicht beimischen, wohl nur selten zu.

Um sich über den Keimgehalt des zur Verwendung kommenden Grundwassers zu unterrichten, ist in manchen Fällen erforderlich, neben dem fraglichen Brunnen einen Rohrbrunnen unter entsprechenden Cautelen einzutreiben, ihn zu desinficiren und dann die Probe zu entnehmen. Auch vorhandene Versuchsrohre in der Umgebung des Brunnens können hierzu benutzt werden, wenn sie gut desinficirt worden sind und ebenso tief hinunterreichen, als der Brunnen, bezw. bis in diejenige Schichttiefe gehen, aus welcher der Hauptbrunnen sein Wasser schöpft.

Gruber[1]) macht in einer sehr beherzigenswerthen Schrift darauf aufmerksam, dass es zuweilen nothwendig sei, abzuwarten, bis das Erdreich um die Rohrbrunnen herum zur Ruhe gekommen sei.

---

[1]) Die Grundlagen der hygienischen Beurtheilung des Wassers. Deutsche Vierteljahrsschrift f. öffentl. Gesundheitspflege 25, 428.

Auch der bereits von Gruber erwähnte Vorschlag, ein Rohr von der Seite oder dem Grunde des Brunnens aus in das Erdreich einzutreiben und dort das Wasser zur Untersuchung zu entnehmen, verdient Berücksichtigung.

Gelingt das Eintreiben eines Rohres in den Kesselbrunnen und steht eine genügende Pumpkraft zur Verfügung, welche den Wasserspiegel stark senkt, so wird der eingetriebene abessinische Brunnen zum artesischen, d. h. über dem Brunnenwasserspiegel wird springbrunnenartig das unter Druck stehende Wasser der tieferen Bodenschichten aus dem eingetriebenen Rohre hervortreten; das längere Zeit hindurch hervordringende Wasser spült das Rohr gründlich aus und man erhält so auf die Frage, ob das eindringende Wasser keimfrei ist, eine correcte Antwort.

Leicht liessen sich noch mehr Varietäten der Probeentnahme anführen; jedoch genügen die vorgeführten Beispiele, gezeigt zu haben, dass es bei der Untersuchung der Filtrationsleistung nicht Princip sein muss, Bakterien finden zu wollen — das ist leicht und führt immer zu einem unrichtigen Schlussresultate —, sondern Bakterien nicht zu finden; beherzigt man diese Mahnung, so werden einwandsfreie Entnahmen gemacht werden.

Bei gewöhnlichen Pumpbrunnen, wo das Wasser nicht mit Maschinenkraft gehoben werden kann, gelangt man mit dem Abpumpen, wie früher gezeigt worden ist, nicht zum Ziele; man wird bei diesen Brunnen die accessorischen Bakterien nicht los. Daher versucht man besser einen Nortonbrunnen in oder neben den Kesselbrunnen zu schlagen und dessen Wasser zu untersuchen. Die Höhe der Kosten wird indessen oft hindernd im Wege stehen, und man wird vielfach unter Verzicht auf eine bakteriologische Untersuchung sich darauf beschränken müssen, aus den örtlichen Verhältnissen Schlüsse über die biologische Qualität des Wassers zu ziehen.

Aus einem gewöhnlichen Kesselbrunnen durch Pumpen oder Schöpfen eine Probe zu entnehmen, in ihr die Arten- und die Individuenzahl zu bestimmen und daraus Schlüsse ziehen zu wollen über den Keimgehalt des eintretenden Wassers, ist nach unseren jetzigen Kenntnissen über die Bakteriologie der Brunnen nicht mehr gestattet.

Zur Entscheidung der Frage, ob unreine Zuflüsse in ein Wasser gelangen, ist die bakteriologische Untersuchung allein wenig geeignet. Die Untersuchung des Gesammtwassers von

Brunnen und Quellen giebt z. B. über unreine Zuflüsse derselben nur in seltenen Fällen eine Auskunft. Die verdächtigen Zuflüsse werden vielmehr durch die Besichtigung festgestellt; die seitlich oder von oben einfliessenden Wasserströmchen lassen sich dann leicht abfangen und bakteriologisch untersuchen. Bei Flüssen und Seen deutet, wie früher schon gesagt, das Ansteigen der Keimzahl auf eine Verunreinigung hin.

Soll See- und Flusswasser untersucht werden, so ist nach der Fragestellung oder dem Zweck zu entscheiden, ob die Probe vom Ufer oder aus der Mitte, von der Oberfläche oder aus der Tiefe zu entnehmen ist.

Die zur Wasserentnahme dienenden Gefässe müssen sterilisirt sein.

Mit sterilisirter Watte geschlossene Kölbchen oder Reagensgläser sind die geeigneten Instrumente zur Entnahme von der Oberfläche bequem und frei vorliegenden Wassers. Muss Wasser dicht unter der Oberfläche geschöpft werden, so verwendet man, sofern man bequem dazu kann, Flaschen mit Glasstöpseln oder Soxhletflaschen mit Gummipfropfen, desinficirt vorher die Hände nach gründlicher Reinigung mit Wasser und Seife, bringt die Flasche geschlossen unter Wasser, so dass der Pfropfen bei fliessendem Wasser gegen den Strom gerichtet ist, wartet einige Minuten, damit die aus den oberen Wasserschichten mitgerissenen Bakterien fortgeschwemmt werden, und öffnet dann den Pfropfen. Sobald genügend Wasser eingeflossen ist, setzt man den Pfropfen, welcher während des Einfliessens dicht neben der Flasche und in gleicher Höhe mit ihr gehalten worden ist, fest auf und hebt die verschlossene Flasche heraus.

Soll unter der Oberfläche eines stagnirenden Wassers geschöpft werden, so sind dieselben Vorsichtsmaassnahmen zu treffen; da sich aber das Wasser nicht bewegt, so schiebt der Entnehmer die Flasche vor, nachdem er sie längere Zeit ruhig dicht vor sich unter Wasser gehalten hat, um auf diese Weise die mitgerissenen Mikroben der oberen Wasserschichten zu entfernen.

Noch einfacher nimmt man statt der Glasflaschen Reagircylinder, welche in ihrem oberen Theile zu einer ziemlich scharf umgebogenen Capillare ausgezogen, dann theilweise luftleer gemacht und zugeschmolzen worden sind.

Ein so präparirtes Röhrchen wird in die Hohlhand genommen und, wie vorhin angegeben, gegen den Strom gebracht. Darauf wird nach kurzer Zeit mit dem Daumennagel der desinficirten, das Gläschen haltenden Hand die Spitze abgesprengt. Beim

Herausnehmen muss die Capillare nach unten sehen und der untere Theil des Röhrchens mit voller Faust gefasst werden, um durch die Erwärmung das Eindringen von Wasser aus den höheren Schichten zu vermeiden.

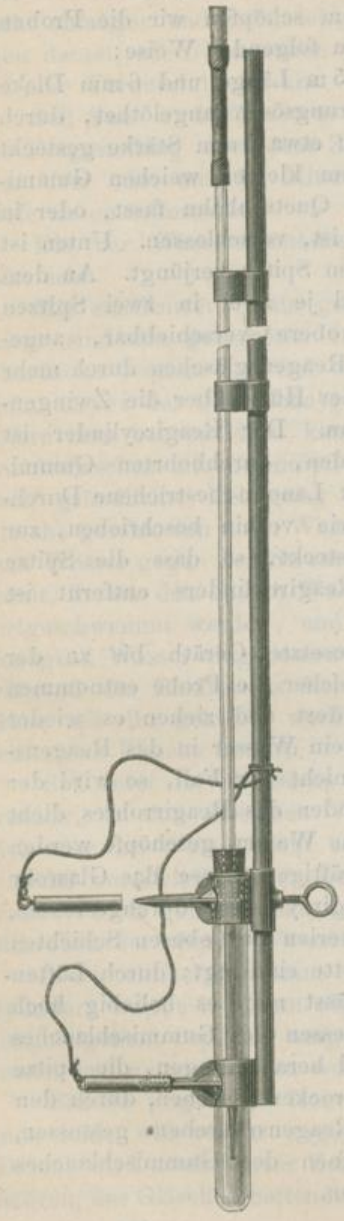
Aus Wassertiefen von $1/2$ bis 3 m schöpfen wir die Proben zur bakteriologischen Untersuchung in folgender Weise:

An einen Eisenstab von etwa 1,5 m Länge und 6 mm Dicke sind in Abständen von 25 cm Führungsösen angelöthet, durch welche ein gewöhnliches Glasrohr von etwa 5 mm Stärke gesteckt ist. Das Glasrohr ist oben mit einem kleinen weichen Gummischlauch, über welchen ein kräftiger Quetschhahn fasst, oder in welchen ein Stück Glasstab gesteckt ist, verschlossen. Unten ist das Glasrohr zu einer kräftigen kurzen Spitze verjüngt. An dem untersten Ende des Eisenstabes sind je zwei in zwei Spitzen auslaufende Zwingen, davon die obere verschiebbar, angebracht, in welchen ein dünnwandiges Reagensgläschen durch mehr oder weniger weites Ueberstreifen einer Hülse über die Zwingenspitzen sicher befestigt werden kann. Der Reagircylinder ist mit einem weichen, gut schliessenden, durchbohrten Gummipfropfen verschlossen. Durch die mit Lanolin bestrichene Durchbohrung des Pfropfens wird die, wie vorhin beschrieben, zur Pipette umgewandelte Glasröhre gesteckt, so dass die Spitze etwa 2 cm von dem Boden des Reagircylinders entfernt ist (Fig. 36, a. f. S.).

Wir führen das so zusammengesetzte Geräth bis zu der Wassertiefe, Felsspalte u. s. w., aus welcher die Probe entnommen werden soll, lassen es eine Minute dort und ziehen es wieder heraus, um uns zu überzeugen, dass kein Wasser in das Reagensröhrchen eingedrungen ist. Ist das nicht der Fall, so wird der Apparat wieder eingeführt, bis der Boden des Reagirrohres dicht über der Stelle steht, von welcher das Wasser geschöpft werden soll, dann wird mit einem kurzen, kräftigen Stosse das Glasrohr vor- und damit der Boden des Reagircylinders durchgestossen, worauf das Wasser, frei von den Bakterien der oberen Schichten und des Bodenschlammes, in die Pipette eindringt; durch Lüften des Quetschhahnes oder Glasstabes lässt man es beliebig hoch steigen und hält es dann durch Schliessen des Gummischlauches in dem Rohre fest. Der Apparat wird herausgezogen, die Spitze des Glasrohres mit sterilisirter Watte trocken gerieben, durch den sterilisirten Pfropfen eines sterilisirten Reagensröhrchens gestossen, und hierauf das Wasser durch Oeffnen des Gummischlauches aus dem Glasrohre keimdicht abgelassen.

Auf den ersten Eisenstab lässt sich ein zweiter und dritter schrauben, und auf das erste Glasrohr ein zweites und drittes Glasrohr mit einem kräftigen kurzen Gummistück fest aufsetzen.

Fig. 36.



Diesen sehr einfachen Apparat haben wir mit gutem Erfolge benutzt, sowohl um Wasser aus bestimmten Tiefen offener Wässer oder aus den unter Wasser der Quellstuben befindlichen Quellzuflüssen zu schöpfen, als auch um Proben aus einem bis zum Wasserspiegel zugängig gemachten Centralbrunnen neben und unter dem Saugkorbe zu fassen.

Das Instrument lässt sich natürlich leicht modificiren, so z. B. durch Ersatz des Glasrohres durch ein Metallrohr, durch Ansetzen einer 50 oder 100 ccm-Pipette an das untere Ende des Glasrohres, durch Anbinden eines luftleer gemachten Condoms an den Gummischlauch, um an dem Aufgetriebenwerden des Condoms die Menge des in die Pipette eingetretenen Wassers abschätzen zu können u. s. w.

Wollen wir Wasser unter Wasser in geringer Tiefe entnehmen, z. B. aus einer Felsspalte einer Brunnenstube, so verschliessen wir die untere Oeffnung einer 100 ccm Vollpipette oder eines Glasrohres mit Paraffin oder Siegellack, führen das Instrument bis zur Entnahmestelle und durchstossen den Pfropfen mit sterilisirtem Draht.

Um das Wasser aus grösseren Tiefen, z. B. aus nicht besteigbaren Kesselbrunnen, dicht über dem Boden zu entnehmen, sind eine ganze Reihe von Apparaten angegeben, die sich in zwei Gruppen eintheilen lassen.

Zu der ersteren gehören die Flaschenapparate. Glasflaschen mit Glasstöpseln werden in einen unten beschwerten Metallrahmen fest eingeschaltet, der obere Theil des Rahmens trägt eine Schnur, an welcher der Apparat niedergelassen wird. In der betreffenden Tiefe wird der Stöpsel durch eine zweite Schnur gehoben, aber nicht aus dem Flaschenhalse herausgezogen, worauf das Wasser eindringt. Der Schluss des Pfropfens geschieht entweder durch sein eigenes Gewicht [Cruz[1])], welches zuweilen noch durch eine Belastung vergrössert ist [Rohrbeck[2])], oder durch Federkraft [Johnston[3]), Heyroth[4])]. Der Apparat des letzten Autors ist, da er zu viel Bakterien aus den oberen Wasserschichten mitnimmt, weniger zu empfehlen.

Die zweite Gruppe der Apparate besteht aus einem beschwerten Reagensröhrchen, welches oben zu einer feinen gebogenen Capillare ausgezogen und durch Erhitzung fast luftleer gemacht ist. Das Röhrchen wird auf die gewünschte Tiefe gebracht und die Capillare zerbrochen, entweder durch Zug an einem Faden, welcher um die gekrümmte Capillare geschlungen ist, oder durch ein an dem Faden, welcher das Röhrchen trägt, niederfallendes, durchlochtes Bleigewicht. Letzteres Verfahren hat den Vorzug, dass man nur eines Fadens bedarf, was angenehm ist, da sich in grösseren Tiefen mit zwei Fäden schlechter arbeiten lässt. Die eine Unterabtheilung dieser zweiten Gruppe lässt die Mündung der Capillare nach oben [Miquel[5]), Russel[6]), Sclavo[7])], die andere nach unten sehen. Erstere Anordnung ist principiell unrichtig; wenn auch in eine eigentliche Capillare Wasser aus den oberen Wasserschichten beim Heraufwinden nicht eindringt, so ist doch zu bedenken, dass das ausgezogene Glasrohr nicht immer überall capillar ist, und dass hier und da Wasser eindringen kann, ohne dass man es merkt.

Dieser Uebelstand wird sicher vermieden, wenn die Capillare nach unten sieht, dann die in der Rundung des Rohres eingeschlossene

[1]) Oswaldo Gonçalves Cruz, Un nouvel appareil pour la recolte des eaux. Rio de Janeiro 1893.

[2]) Rohrbeck, Katalog, S. 131.

[3]) Wyatt Johnston, On the collection of samples of water, for bacteriological analysis. Canadian report of science 1892.

[4]) Reiseausrüstung für Zwecke der Entnahme und bakteriologischen Untersuchung von Wasserproben. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte **7**, 381.)

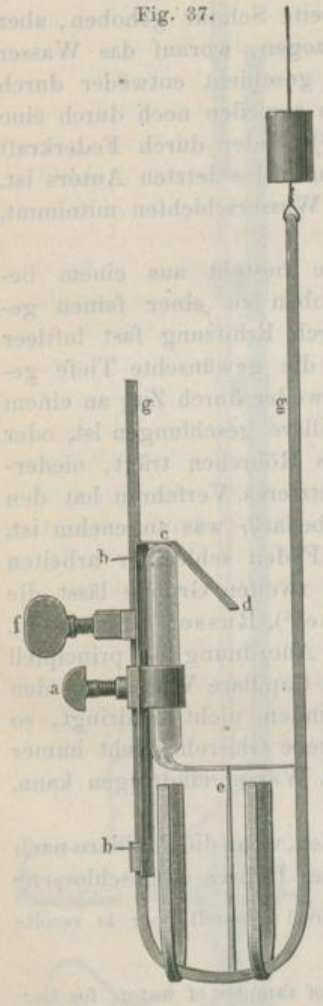
[5]) Manuel pratique d'analyse bact. des eaux 1892, p. 5.

[6]) Untersuchungen über im Golf von Neapel lebende Bakterien. Zeitschrift f. Hygiene u. Infectionskrankheiten **11**, 168.

[7]) Sclavo, Di un nuovo apparecchio par la presa dell' acque a profondita. Ministerio dell' Interno 1892. Ref. in Hygien. Rundschau 1893, S. 194.

Luft dehnt sich in den oberen Wasserschichten entsprechend dem abnehmenden Druck aus und drückt höchstens von dem in der Tiefe aufgenommenen Wasser etwas hinaus. Ist das ausgezogene Rohr an einer nicht capillaren Stelle gesprungen, so lässt es oberhalb des Wassers den Inhalt ausfliessen und der Versuch muss wiederholt werden. Ein Apparat der letzten Art ist von Runschke[1]) angegeben.

Fig. 37.



Wir benutzen einen ähnlichen, beistehend abgebildeten Apparat. Ein luftleer gemachtes Reagirrohr mit lang ausgezogener Capillare wird mittelst eines breiten, dünnen, durch die Schraube *a* anspannbaren Kupferbandes so gegen den flachen Kupferstab *b* befestigt, dass seine Kuppe sich in eine Oeffnung *c* des in die Platte *d* auslaufenden Metallstabes *b* einstemmt. Darauf wird der Metallstab *b* mit dem an ihm befestigten Reagirrohre so weit gesenkt, dass die Capillare auf der von unten hervorragenden Schneide *e* aufliegt, und nun mit der Schraube *f* an dem starken Kupferstabe *g* des Gestelles festgeschraubt.

Umgeben ist der Apparat von vier aufwärts gebogenen Armen, um das Glas gegen Stösse zu schützen. Ein an dem Faden niedergehendes Stückchen Bleirohr schlägt die Spitze der Capillare auf oder an der Schneide ab.

Für die Entnahme aus grossen Tiefen ist von B. Fischer[2]) ein Apparat angegeben, welcher aus dem Tiefseewasserschöpfapparate von Sigsbec entstanden ist. Das Wasser tritt beim Nieder-

---

[1]) Jahresber. d. chem. Untersuchungsamtes d. Stadt Breslau 1891, S. 17.

[2]) Ueber das Grundwasser von Kiel u. s. w. Zeitschrift f. Hygiene und Infectionskrankheiten 13, 260.

gehen durch ein mittelst sich drehender Flügelschraube geöffnetes Ventil durch den Apparat hindurch. Wird der Apparat nicht weiter gesenkt, so schliesst sich das Ventil durch seine Schwere und bleibt durch den Gegendruck der Flügelschraube beim Herausziehen geschlossen.

Im Allgemeinen soll bei derartigen Untersuchungen der Experimentator die Proben selbst entnehmen und gleich an Ort und Stelle verarbeiten, entweder — und zwar am besten — zu Rollröhrchen- oder zu Schalenculturen. Jedes Rollröhrchen wird zuerst in Papier und dann in sehr wenig Watte gewickelt; die Schalen stecken wir in viereckige passende Papierdüten, welche man in jeder Apotheke oder Materialwaarenhandlung bekommen kann, legen zwischen die einzelnen Schalen sehr dünne Schichten Watte, wickeln dann alle zusammen in ein Papier, umgeben sie mit einer dickeren Schicht Watte und schlagen das Ganze nochmals in Papier ein. Diese Umhüllung schützt gegen Kälte und Hitze.

Müssen die Wasserproben verschickt werden, so sind die Capillaren kurz zuzuschmelzen, doppelt etiquettirt, in einen wasserdichten Kasten (Deckelverschluss mit Gummipackung und Schrauben) zwischen Watte zu verpacken. Dieser Kasten ist in einen zweiten ebenfalls wasserdichten Kasten so einzustellen, dass der erstere Kasten überall von Eisstückchen umgeben ist.

Sollen Flaschen verpackt werden, so sind die Stöpsel fest mit Pergamentpapier zu überbinden, welches in Sublimatlösung gelegen hat. Nachher werden sie behandelt wie die Röhrchen. Von Heyroth, von Praussnitz und A. Pfuhl sind besondere Kästchen angegeben zur Aufnahme der Röhrchen. Im Wesentlichen bestehen sie aus einem gut schliessenden Blechkasten, welcher gelochte Einsätze zur Aufnahme der Flaschen oder Röhrchen enthält.

Bei der Ankunft der Proben muss sofort ihre Verarbeitung beginnen und in einem der Gläser gleich nach der Entnahme der zur Plattencultur erforderlichen Wassermengen mit einem genauen Thermometer die Temperatur festgestellt werden.

Die mikroskopische Untersuchung.

b) Die Untersuchung der ungefärbten Präparate.

Man bringt zum Beginn der Untersuchung je einen kleinen Tropfen des zu prüfenden Wassers auf die Mitte zweier gut gereinigter Deckgläschen und legt diese, bis das Wasser verdunstet

ist, auf Fliesspapier unter eine Glasglocke. Während dieser Zeit werden zunächst die Platten- bezw. Rollröhrchenculturen angelegt, wie unter e) dieses Capitels beschrieben ist. Dann bestreicht man den Rand des Schliffes eines hohlen Objectträgers mit Vaseline, träufelt einen kleinen Tropfen des zu untersuchenden Wassers auf ein Deckgläschen und legt dasselbe so auf den Hohlschliff, dass der hängende Tropfen weder den Boden noch den Rand berührt. In derselben Weise wird ein zweiter hohler Objectträger beschickt. Sodann wird der Tropfen bei mittelweiter Blende und 100 facher Vergrösserung durchforscht. Hierbei erkennt man Algen, Diatomeen und grössere Wasserthierchen, beobachtet die Ortsveränderung der mit Bewegung begabten Wesen und betrachtet die grösseren anorganischen Partikel, sowie pflanzliche und thierische Reste. Nach dieser Orientirung über die gröberen Partikel bringt man eines der erkannten Objecte oder den Rand des Tropfens in die Mitte des Gesichtsfeldes. Dann schaltet man statt des Trockensystems die Immersionslinse ein (ein sogenannter Revolver ist für den Systemwechsel sehr zu empfehlen), legt, wenn erforderlich, eine etwas weitere Blende ein, bringt einen nicht zu kleinen Tropfen Oel auf das Deckgläschen, nimmt das schwache Ocular und stellt das in die Mitte gebrachte Object vorsichtig und genau ein. Man kann auch einen Wassertropfen auf einen Objectträger bringen, ihn mit einem Deckgläschen bedecken und nun untersuchen. Statt der Oelimmersion lässt sich in diesem Falle auch gut ein stärkeres Trockensystem verwenden.

Bei der Durchmusterung des Tropfens sieht man, welcher Art die anorganischen Reste, die pflanzlichen und thierischen Gebilde sind.

Die Molecularbewegung kleinster Körperchen darf nicht als eine selbständige Bewegung angesehen werden.

Zuletzt giesst man den Rest des zu untersuchenden Wassers in ein Spitzglas, deckt eine Glasplatte darüber und lässt es ungefähr 24 Stunden an einem kühlen Orte ruhig stehen. In dieser Zeit senken sich die meisten grösseren suspendirten Substanzen zu Boden und ihnen folgt gewöhnlich ein erheblicher Theil der mit Bewegung begabten Wesen. Eine mit sterilisirter Pipette vom Boden des Glases entnommene Probe enthält daher besonders reichliche Mengen der in dem Wasser befindlichen geformten Theile. Zwei solcher Tropfen werden in hohlen Objectträgern untersucht.

Den Bakterien, welche sich wahrscheinlich in der Zwischenzeit wesentlich vermehrt haben, braucht man besondere Aufmerksam-

keit nicht zu schenken; sie werden besser in den gefärbten Präparaten erkannt. Dagegen hat man auf die Anwesenheit von *Crenothrix, Beggiatoa,* ferner von Eiern der Eingeweidewürmer, von Muskelfaserstückchen u. s. w. zu achten.

Inzwischen ist das Wasser der am ersten Tage aufgetragenen Tropfen verdunstet. Wenn man Ursache hat, auf die Ausscheidung von Salzen (siehe S. 416 und Taf. I) zu untersuchen, so werden die Deckgläschen mit den angetrockneten Tropfen nach oben mittelst schwacher und mittelstarker Vergrösserung und enger Blende untersucht. Darauf schreitet man zu ihrer Färbung.

c) Die Untersuchung der gefärbten Präparate.

Die lufttrockenen Deckgläschen werden mit einer Pincette gefasst und mit der bestrichenen Seite nach oben zweimal rasch hinter einander durch die Flamme eines Bunsenbrenners oder dreimal durch die Flamme einer Spirituslampe gezogen. Das jedesmalige Durchziehen soll ungefähr eine Secunde währen.

Nach R. Koch fixirt man hierdurch die Mikroorganismen, ohne ihre Form wesentlich zu verändern und ohne ihre Färbbarkeit zu vermindern, während die Albuminate unlöslich werden und störende Niederschläge nicht mehr bilden können.

Auf das getrocknete und erhitzte Präparat lässt man einen oder mehrere Tropfen der Farbflüssigkeit, am besten Victoriablau, fallen und dort ungefähr fünf Minuten verweilen.

Da in reineren Wässern nur wenige Organismen sich finden, so muss das Bestreben dahin gehen, diese wenigen Mikroben möglichst sichtbar zu machen. Zu dem Zwecke empfiehlt sich bei Wasseruntersuchungen eine von der soeben erwähnten Methode etwas abweichende Färbung. Man giesst einige Cubikcentimeter der Farblösung, am besten Methylenblaulösung, in ein flaches Schälchen und lässt die Deckgläser mit der bestrichenen Seite nach unten mehrere Stunden darauf schwimmen. Durch Erwärmen der Lösung auf etwa 60° wird die Intensität der Färbung erhöht, bezw. die zum Färben erforderliche Zeit abgekürzt.

Hat das Präparat Farbe angenommen, was beim Neigen des Deckgläschens leicht daran zu erkennen ist, dass die Stelle, an welcher der Wassertropfen eingetrocknet ist, tiefer gefärbt erscheint, so spült man den Ueberschuss des Farbstoffes durch einen schwachen Strahl reinen Wassers vorsichtig fort und legt das Deckgläschen mit der noch feuchten Präparatseite auf den Objectträger, wobei man das Einschliessen von Luftblasen sorgfältig

vermeidet. Das überschüssige Wasser wird mit Hülfe von Filtrirpapier entfernt und die Rückseite des Gläschens trocken gewischt.

Die Untersuchung geschieht, wie beim hängenden Tropfen, zuerst mit schwachem Objectiv, starkem Ocular und mittlerer Blende, dann mit schwachem Ocular, Oelimmersion und unter voller Beleuchtung, also ohne Blende. Sie hat sich auf alle Objecte zu erstrecken; bei den aus dem frischen Wasser erhaltenen gefärbten Präparaten steht indessen die Untersuchung auf Schizomyceten im Vordergrunde.

Bei dem Verdunsten des Wassertropfens lagern sich seine gelösten und suspendirten Bestandtheile vornehmlich in der Randzone ab. Dort finden sich die meisten Mikroorganismen, unter denen einzelne Kokken allerdings nur schwierig mit Sicherheit zu erkennen sind, weil auch der Farbstoff in Gestalt kleiner Kugeln sich ausscheiden kann; dort liegt ferner jene äusserst fein vertheilte Masse, welche man mit dem Namen Detritus bezeichnet, und die nur in wenigen Wässern ganz zu fehlen scheint.

Es kommt vor, dass aus Präparaten, welche nicht sehr sorgfältig angefertigt worden sind, ein Theil der Bakterien bei dem Befeuchten mit Wasser sich loslöst. Dieselben werden dann von dem Wasserstrome durch das Gesichtsfeld geschwemmt. Solche Bewegungen dürfen nicht als selbständige aufgefasst werden.

Soll ein Präparat conservirt werden, so entfernt man zuerst das Oel durch einmaliges Ueberwischen mit dem Finger, bringt einen Tropfen Wasser an den Rand des Deckgläschens, wodurch ein leichtes Abheben ermöglicht wird, hebt ab, tupft das Wasser mit Filtrirpapier fort, lässt vollständig lufttrocken werden und legt das trockene Präparat auf einen Objectträger, auf welchen man vorher ein Tröpfchen Canadabalsam gebracht hat. Je intensiver die Päparate gefärbt sind, um so länger halten sie sich; sie müssen gleichwohl im Dunkeln aufbewahrt werden.

Für die meisten Fälle ist es ausreichend, wenn man bloss am zweiten Tage aus dem Bodensatze des Spitzglases Tropfen in die Kammern von hohlen Objectträgern bringt, sie ungefärbt mikroskopirt und auf pflanzliche und thierische Wesen, mit Ausschluss der Bakterien, sowie pflanzliche und thierische Reste und anorganische Partikel untersucht, denn die Mikroorganismen kommen besser durch die Cultur zur Anschauung.

d) **Die Geisselfärbung [nach v. Ermengem[1]) und Bunge[2])].**

Die Geisselfärbung ist von Löffler zuerst mit Erfolg ausgeführt, doch ist jene Methode etwas umständlich, wir geben daher zwei spätere aber gute Methoden, wollen indessen hervorheben, dass auch bei diesen einige Uebung zunächst erforderlich ist, um gute Bilder zu erhalten.

Um gute Präparate zu erzielen, sind 10 bis 18 Stunden alte Agarculturen zu verwenden, von welchen nur wenige im reinsten destillirten Wasser gehörig vertheilte Bakterien auf das Deckgläschen zu bringen sind. Da selbst die geringsten Spuren von Schmutz störende Niederschläge verursachen, so müssen die neuen Deckgläschen zu ihrer Reinigung zuerst in einer Lösung von Kaliumbichrom. 60, Acid. sulf. conc. 60, Aq. dest. 1000 gekocht, dann in Wasser gespült und in absoluten Alkohol gelegt werden; darauf werden die Gläschen zur Verdunstung des Alkohols senkrecht unter eine Glocke gestellt. Zettnow[3]) wischt die neuen Deckgläschen mit alkoholfeuchtem Tuche kräftig ab und legt sie dann auf ein Stück Schwarzblech, welches mittelst eines Bunsenbrenners einige Minuten erhitzt wird. Das mit dem Bakterienmaterial beschickte Deckgläschen lässt man lufttrocken werden und zieht es, indem man es mit den Fingern festhält, dreimal durch die Flamme. Hiernach tropft man eine Fixationsflüssigkeit auf, bestehend aus einem Theile 2 proc. Acid. osmicum und zwei Theilen 10- bis 25 proc. acid. tannicum; zu 100 ccm der Gerbsäurelösung setzt v. Ermengem vier bis fünf Tropfen Eisessig. Die Flüssigkeit muss eine halbe Stunde kalt, oder fünf Minuten auf 50 bis 60° erwärmt einwirken.

Nachdem die Präparate sorgfältig in Wasser und dann in Alkohol ausgewaschen sind, taucht man sie einige Secunden in eine Lösung von 0,25- bis 0,5 proc. Arg. nitricum (Sensibilisirungsbad), aus dieser werden sie, ohne vorherige Abspülung, in eine Lösung gebracht von Acid. gallicum 5, Acid. tannicum 3, Natr. aceticum fusum 10, Aq. dest. 350 und dann nach einigen Augenblicken in die Silberlösung zurückgelegt. Sobald diese sich zu schwärzen beginnt, nimmt man die Deckgläschen heraus, trocknet sie und legt sie mittelst Canadabalsam auf den Objectträger. Gut gelungene

---

[1]) Trav. du labor. d'hygiène et de Bactériologie de l'Univ. de Gand. T. I, fasc. 3.

[2]) Fortschritte der Medicin 1894, S. 463, 652, 929.

[3]) Centr. f. Bakt. u. Par. 14, 63.

Präparate zeigen die Bakterien schwarzbraun, die Geisseln tief schwarz gefärbt.

Bunge verwendet drei Theile concentrirter wässeriger Tanninlösung und einen Theil einer wässerigen Verdünnung von Liquor ferri sesquichlorati (1 : 20 Wasser) und setzt zu 10 ccm der Mischung 1 ccm concentrirte wässerige Fuchsinlösung hinzu. Diese Beize muss mehrere Tage oder Wochen an der Luft stehen, bis sie durch Oxydation rothbraun wird; man kann die Oxydation rasch erreichen durch Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd zu der frischen Beize, bis die erwähnte rothbraune Färbung auftritt; hierzu ist etwa $^1/_2$ ccm einer 3 proc. Wasserstoffsuperoxydlösung zu 5 ccm der Beize erforderlich. Das Präparat fertigt man in der Weise an, dass man auf ein Deckgläschen etwas von der zu untersuchenden Cultur (drei Tage alte geben die besten Bilder) in ein Tröpfchen destillirten Wassers giebt, von hier aus inficirt man ein zweites Wassertröpfchen und entnimmt von diesem eine geringe Menge, um sie auf ein, wie vorhin angegeben, gereinigtes Deckgläschen gleichmässig auszustreichen. Das Präparat wird an der Luft getrocknet und unter Vermeidung zu starker Erwärmung einmal durch die Flamme eines Bunsenbrenners gezogen. Darauf wird die mit Wasserstoffsuperoxyd frisch oxydirte Beize durch ein doppeltes Filter auf das Deckgläschen gegeben, dort eine bis mehrere Minuten belassen und sehr sauber unter der Wasserleitung abgespült. Das hiernach getrocknete Präparat wird mit Carbolgentianaviolett gefärbt, abgespült, getrocknet und in Canadabalsam gelegt. Diese Farbflüssigkeit wird hergestellt durch Zusatz von einigen Tropfen concentrirter alkoholischer Gentianaviolettlösung zu einigen Cubikcentimetern einer 5 proc. Carbollösung.

Die biologische Untersuchung.

e) Die Cultur der im Wasser enthaltenen Mikroorganismen und das Zählen derselben.

Um die in einem Wasser enthaltenen Mikroorganismen nach Zahl und Art in die Erscheinung treten zu lassen, ist es nothwendig, sie in einem flüssigen Medium zu vertheilen, welches

1. für die Mikroorganismen ein möglichst angemessener Nährboden ist und
2. kurze Zeit nach der Mischung gelatinirt.

Durch das Gelatiniren werden die einzelnen Mikroorganismen an der Stelle, welche sie gerade innehaben, festgeklebt und können

sich mit anderen gleichzeitig vorhandenen Mikroben nicht mehr mischen. Da die Bakterien sich zugleich in einem guten Nährsubstrat befinden, so vermehren sie sich daselbst, und die neu entwickelten Bakterien lagern sich in dem festweichen Nährboden unmittelbar den älteren an. So entstehen im Verlaufe von wenigen Tagen in dem Nährsubstrate aus den einzelnen Keimen Bakterienanhäufungen, sogenannte Colonien, welche schon dem unbewaffneten Auge sichtbar sind. Die Colonien der verschiedenen Bakterienarten bieten in Gestalt, Farbe, Grösse etc. Verschiedenheiten, die besonders bei der Beobachtung unter dem Mikroskope hervortreten. Um die Cultur bei durchfallendem Lichte untersuchen zu können, muss sowohl sie selbst als auch ihre Umgebung und ihre Unterlage durchsichtig sein. Diesen Anforderungen entspricht am besten die Cultur in Nährgelatine auf Glasplatten oder in Schalen.

Die Anlage dieser „Plattenculturen" geschieht zweckmässig in folgender Weise:

In ein Röhrchen, welches verflüssigte, aber höchstens 37° warme, keimfreie Nährgelatine enthält, lässt man an der Gefässwand entlang 1 ccm des zu prüfenden Wassers fliessen, welches mit sterilisirter, graduirter Pipette dem Aufsammelgefässe entnommen worden ist. Dann verstöpselt man das Reagensröhrchen, dessen Pfropfen man vorsichtig losgedreht und während des Einfüllens der Wasserprobe unter Beobachtung der Seite 664 erläuterten Vorsichtsmaassregeln zwischen den Fingern gehalten hat, und mischt das Wasser mit der Nährgelatine durch langsames Auf- und Abneigen unter Vermeidung von Blasenbildung. Durch sorgfältiges Mischen werden die in dem Wasser enthaltenen einzelnen Mikroorganismen in der Nährgelatine möglichst gleichmässig vertheilt.

In derselben Weise wird einem zweiten Röhrchen $^1/_2$ ccm, einem dritten ein Tropfen Wasser hinzugefügt. Nie präparire man weniger als zwei Röhrchen von demselben Wasser, sowohl der Controle wegen, als auch, um bei Verunglücken des einen Röhrchens an dem zweiten Ersatz zu haben.

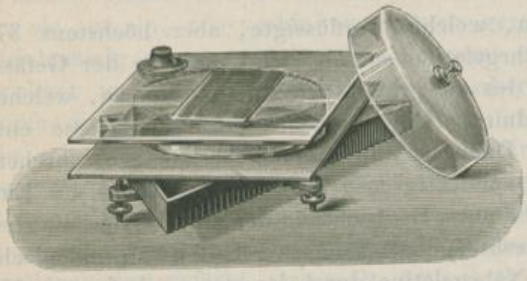
Vermuthet man viele Organismen in dem betreffenden Wasser, worüber man sich durch ein rasch angefertigtes, gefärbtes Trockenpräparat einige Auskunft verschaffen kann, so beschicke man die Röhrchen mit $^1/_5$ ccm, bezw. einem Tropfen Wasser; die Anzahl Tropfen pro Cubikcentimeter der benutzten Pipette ist durch Abzählen zu bestimmen. Man kann auch 1 ccm des zu prüfenden Wassers mit 10 ccm oder mehr keimfreien Wassers mischen, so die Zahl der Keime herabmindern und von der Mischung 1, $^1/_2$, $^1/_5$, $^1/_{10}$ ccm zur Untersuchung benutzen.

Mehr als 5000 bis 10000 Colonien auf einer Platte lassen sich schlecht zählen; man bestrebe sich daher, nur so viel Wasser zur Untersuchung zu verwenden, dass diese Zahl nicht allzu sehr überschritten wird.

Hat man das zu untersuchende Wasser auf die angegebene Weise mit der Nährgelatine gemischt, so wird die Mischung auf Glasplatten ausgegossen. Behufs Abkühlung der letzteren legt man sie einige Zeit auf eine Glasscheibe, welche eine mit Eis oder kaltem Wasser gefüllte Schale deckt; diese wird auf einem Nivellirständer (Fig. 38) horizontal eingestellt. Um das Auffallen von Keimen aus der Luft zu verhüten, stülpt man über die Versuchsplatten eine Glocke.

Da beim Ausgiessen der Mischung Mikroorganismen, welche an dem Rande des Reagensröhrchens haften, die Cultur verunreinigen können, sterilisirt man den Rand durch Erhitzen über einer Gas- oder Spiritusflamme. Man lässt abkühlen und giesst dann langsam den Inhalt auf die oberste der gekühlten Platten, sie so mit einem sterilen Glasstabe vertheilend, dass sie eine gleichmässige, rechteckige Fläche bildet, deren Rand überall noch ungefähr 1 cm vom Plattenrande entfernt bleibt. Nachdem die Gelatine vollständig erstarrt ist, überträgt man die Platte in die vorher präparirte feuchte Kammer. Die feuchte Kammer hat den Zweck, die Nährgelatine vor Verunreinigung durch Luftkeime und vor dem Austrocknen zu schützen. Das zweite bezw. dritte und vierte Röhrchen werden in gleicher Weise behandelt und die Platten in dieselbe Glocke auf Bänkchen gebracht. Genaues Etiquettiren der Bänkchen und der Kammer ist nothwendig.

Fig. 38.



Glasplatte auf der mit Eis gefüllten Schale eines Nivellirständers.

Die mit den Culturplatten besetzte Glocke stellt man in einen circa 20 bis 22° C. warmen Raum und belässt sie dort während mindestens dreier Tage[1]). In dieser Zeit haben sich die meisten

[1]) Ein Nachsehen der Platten, womöglich ohne den Deckel zu lüften, ist schon am zweiten Tage erforderlich, um sich über die ungefähre Zahl und Art

der in der Nährgelatine wachsenden Keime zu Colonien ausgebildet, welche mit blossem Auge oder der Lupe erkennbar sind. Je länger man mit dem Zählen warten kann, desto genauere Resultate erhält man.

Sind gar keine oder nur wenige verflüssigende Colonien vorhanden, so zähle man nicht vor dem fünften oder sechsten Tage; des Oefteren macht jedoch die rasch fortschreitende Verflüssigung der Nährgelatine das Zählen am dritten und in Ausnahmefällen (s. die Anmerkung) schon am zweiten Tage erforderlich. Um der zu starken Ausbreitung der verflüssigenden Colonien in etwas entgegenzutreten, tupft man die verflüssigte Gelatine mit Filtrirpapier fort und bepinselt den Rand der verflüssigten Stelle mit einer starken Lösung von Kaliumpermanganat. Die Schimmelwucherungen betupft man, so lange sie klein sind, mit Sublimat-Collodium. Durch vorsichtige Anwendung dieser Mittel gelingt es oft, eine Platte noch zu erhalten, welche sonst in kurzer Zeit unbrauchbar geworden wäre. Nach verschieden langen Zeiten gezählte Platten sollen ohne Angabe des Zeitunterschiedes nicht mit einander verglichen werden.

Zum Zwecke des Zählens legt man die Gelatineplatte auf einen matten, schwarzen Untergrund und überdeckt sie in einem gewissen Abstande mit einer in Quadratcentimeter getheilten Glasplatte.

Nun zählt man mit Benutzung einer gewöhnlichen Lupe die entwickelten Colonien, wobei kleine, glänzende, sehr langsam wachsende und auf Wasserplatten häufig vorhandene Colonien nicht zu übersehen sind. Ist die Colonienzahl sehr gross, so zählt man nur wenige Quadratcentimeter der Platte und berechnet aus dem Durchschnitt die Gesammtsumme für die ganze Platte. Bei stark bewachsenen Platten wendet man Zählplatten an, auf welchen einzelne Quadratcentimeter noch in Unterabtheilungen getheilt sind, oder man zählt nach Neisser unter dem Mikroskop mindestens dreissig Gesichtsfelder und findet dann die Gesammtzahl der Colonien durch Rechnung. Die Grösse des Gesichtsfeldes muss bekannt sein; bei Zeiss Objectiv *AA*, Ocular 2 und gewöhnlicher Tubuslänge beträgt sie 4,1548, bei Zeiss Apochromat 16 mm, Ocular IV 3,1416, bei Leitz Ocular 1, Objectiv III 4,1516, bei Seibert Ocular 1, Objectiv II 2,167, bei Winkler Ocular 1, Objectiv II 6,1575 Quadratmillimeter[1]).

der verflüssigenden Colonien und über etwaige Schimmelbildung zu orientiren, damit nicht die Platten durch diese Organismen vorzeitig zerstört werden. Droht Gefahr, so sind die Platten sofort weiter zu verarbeiten.

[1]) Zeitschr. f. Hygiene u. Inf. 20, 119.

Die Summe der Keime wird stets für einen Cubikcentimeter Wasser angegeben. Wenn es darauf ankommt, ganz genaue Zahlen zu erhalten, so muss auch derjenige Theil der Gelatine berücksichtigt werden, welcher im Reagensrohre zurückbleibt. Zu dem Zwecke werden die ausgegossenen Röhrchen mit Watte geschlossen, etiquettirt neben der Glocke aufgehoben und später auf darin gewachsene Colonien untersucht, deren Zahl der Colonienzahl der Platten hinzugefügt wird.

Schon früher haben wir darauf aufmerksam gemacht, dass bei der Anfertigung der Platten unter Umständen Keime aus der Luft als Verunreinigungen auf dieselben gelangen können; bei ruhigem, vorsichtigem Arbeiten braucht man für die Platte höchstens sechs additionelle Keime zu rechnen.

Für Wasseruntersuchungen eignet sich in vielen Fällen ein von E. von Esmarch angegebenes Verfahren[1]). Esmarch füllt 1 ccm bezw. $^1/_2$ ccm und einen Tropfen des zu untersuchenden Wassers in ein Reagensröhrchen mit verflüssigter Nährgelatine, verschliesst es mit dem Wattepfropfen und zieht über diesen eine Gummikappe. Das auf diese Weise vor dem Eindringen von Flüssigkeit geschützte Gläschen wird, nachdem vorher Wasser und Gelatine gemischt worden sind, in einer Schüssel mit Eiswasser so lange gedreht, bis die Gelatine in dünner, gleichmässiger Schicht an der Glaswandung erstarrt ist. Man achte darauf, dass nicht die Gelatine mit dem Pfropfen in Berührung komme. Auch nehme man, wenn die Gelatine fest geworden ist, um den Gasaustausch nicht zu behindern, was ein verzögertes Wachsthum zur Folge haben kann, die Gummikappe ab. Die eingesäeten Keime wachsen wie gewöhnlich zu Colonien aus und werden gezählt. Das Zählen lässt sich bequem bewerkstelligen, wenn man die Oberfläche des Röhrchens mittelst Farbstrichen in einzelne Felder theilt, oder wenn man den ebenfalls von Esmarch angegebenen, von Rohrbeck in Berlin gefertigten, mit Lupe versehenen Zählapparat benutzt.

Wenn die Röhrchen nicht unter 22° C. gehalten werden können, z. B. in der heissen Zeit, oder wenn das Auftreten grosser Mengen verflüssigender Colonien in Frage kommt, benutzt man statt der Nährgelatine besser die Nähragargallerte, setzt aber, um das lästige Abscheiden von Wasser so viel als möglich zu verhüten, 2 Proc. Gelatine hinzu. Sofern Nährgelatine verwendet wird, räth Esmarch an, den Zusatz von Gelatine zu erhöhen.

---

[1]) Zeitschrift f. Hygiene 1, 293.

Noch ein anderes Verfahren muss erwähnt werden. Petri benutzt statt der mit Eis gefüllten Glasglocke, des Nivellirständers, der Glasplatten und der feuchten Kammer flache, 1 bis 1,5 cm hohe, gläserne Doppelschalen von 10 bis 15,0 cm Durchmesser. In diese auf gewöhnliche Weise sterilisirten Glasschalen wird 1 ccm bezw. 0,5 ccm bezw. ein Tropfen des zu untersuchenden Wassers hineingegeben, mit der verflüssigten Nährgelatine vorsichtig überschüttet und gemischt. Die Mischung erstarrt rasch in gleichmässiger, wenige Millimeter dicker Schicht, welche nur sehr langsam eintrocknet. Noch länger hält sich die Gelatine feucht, wenn man mehrere derartige Schalen unter eine Glasglocke bringt, die mit Wasser benetztes Filtrirpapier enthält. Um die gewachsenen Colonien zu zählen, stellt man die Schale auf eine gewöhnliche Zählplatte, welche auf einen schwarzen Untergrund gelegt ist. Bei der geringen Höhe des Schalenrandes lässt sich die Unterschale mit der darin enthaltenen Gelatine bequem unter das Mikroskop bringen und dort genau so wie eine Platte untersuchen. Es liegt auf der Hand, dass das angegebene Verfahren in vielen Fällen geeignet ist, die etwas umständliche Plattenmethode in vorzüglicher Weise zu ersetzen.

Ebenso praktisch als diese Schalen sind die von Soyka angegebenen. Sie sind den Petri'schen Schalen ähnlich, aber viel flacher und haben nicht senkrechte, sondern im stumpfen Winkel abstehende Ränder. Die Schalen eignen sich vorzüglich zur Anfertigung der Platten, d. h. Schalenculturen an Ort und Stelle. Král empfiehlt, sie in ein entsprechend geformtes Blechgefäss zu stellen behufs leichteren Transportes. Wir schieben dieselben, wie erwähnt, in Papierdüten.

Das Esmarch'sche Rollröhrchenverfahren ist vor Allem dann am Platze, wenn es darauf ankommt, möglichst genau eine geringere Zahl von Mikroorganismen in einem Wasser festzustellen — so z. B. wenn es sich darum handelt, zu entscheiden, ob ein Wasser keimfrei ist oder nicht. — Dahingegen ist die Platten- und Schalenmethode besser, wenn es darauf ankommt, Artbestimmungen vorzunehmen — z. B. bei der Untersuchung auf Typhus und Cholera.

f) Die Untersuchung der Platten.

Nach Feststellung der Zahl der Colonien erübrigt es, die Art derselben zu studiren, hauptsächlich so weit die pathogenen und verdächtigen Bakterien in Frage kommen. Zu dem Zwecke bringt man die Platte auf den Objecttisch des Mikroskopes, welches mit

starkem Ocular, schwachem Objectiv und enger Blende ausgestattet ist. Bei dieser — 80- bis 120 fachen — Vergrösserung betrachtet man die einzelnen Colonien. Es wird zunächst der Rand beobachtet, ob er in gleichmässiger oder ungleichmässiger Krümmung verläuft, ob davon strahlenförmige oder gewundene Fortsätze ausgehen, ob er sich wallartig, oder in dünner, membranartiger Form vorschiebt; ferner sind zu berücksichtigen: die Grösse, die Farbe, die Lichtbrechung, die Körnung, der Bau der Colonien, ob sie als mehr oder minder kugelige oder bröckelige Massen in oder auf der Gelatine liegen, ob sie ganz flach oder terrassenförmig sind u. s. w. Wenn die Gelatine durch die Mikroorganismen verflüssigt worden ist, so hat man festzustellen, welcher Art die Verflüssigung ist, ob sich dabei ein Geruch entwickelt, ob Bewegung in der Colonie ist u. s. f.

Es kann nicht genug empfohlen werden, die Colonien genau zu studiren, denn sie bieten so viele charakteristische Eigenthümlichkeiten, dass man daraus in sehr vielen Fällen die Art der Organismen besser erkennen kann, als aus den gefärbten Präparaten.

Bei der Revision der Platten hat man selbstverständlich in erster Linie sein Augenmerk darauf zu richten, etwaige pathogene Mikroorganismen herauszufinden; von allen irgendwie verdächtigen Colonien sind Proben zu entnehmen und weiter zu bearbeiten.

Für andere Zwecke sind auch die übrigen Organismenhaufen in Betracht zu ziehen. Ihre Mannigfaltigkeit ist meistens geringer, als man der Colonienzahl nach erwarten sollte.

Früher glaubte man, dass die die Gelatine verflüssigenden Bakterien Fäulnisserreger seien. Diese Annahme hat sich jedoch als unbegründet erwiesen, und hat man die Trennung in „verflüssigende“ und „nicht verflüssigende“ Colonien als eine unnöthige Complication fallen lassen.

g) Die Entnahme der Bakterien aus einer einzelnen Colonie.

Die Entnahme geschieht stets unter Controle des Mikroskopes bei 80- bis 120 facher Vergrösserung.

Man biegt eine feine Platinnadel ungefähr 1 mm von ihrem Ende in einen Winkel von etwa 120°, sterilisirt sie durch Erhitzen und lässt sie erkalten. Die Colonie, von welcher abgeimpft werden soll, wird in die Mitte des Gesichtsfeldes geschoben, die rechte Hand fest aufgestützt und die Spitze der Nadel unter die Mitte des Objectivs gebracht. Nun blickt man durch das Ocular. Sobald die Nadel, wenn auch undeutlich, sichtbar ist, wird sie

gesenkt, vor- oder zurückgeschoben, bis die Spitze derselben deutlich erkennbar dicht über der Colonie schwebt. Dann taucht man die Spitze in die Colonie und hebt sie langsam senkrecht wieder heraus. Bei grossen Colonien, besonders bei verflüssigenden, berührt man mit der Nadel nicht die Mitte, sondern nur eine Stelle des Randes, um möglichst sicher zu sein, jede Verunreinigung der entnommenen Probe auszuschliessen. Hat die Nadel ausser dem zu prüfenden Bakterienhaufen noch eine andere Colonie oder überhaupt irgend einen fremden Gegenstand berührt, so ist sie zu sterilisiren und der Versuch zu wiederholen.

Zu einer solchen Probeentnahme bedarf man zwar einiger Uebung, doch ist die soeben erläuterte Manipulation nicht zu umgehen, wenn eine reine Abimpfung gesichert sein soll.

h) Die weitere Behandlung der entnommenen Keime.

1. Die Anfertigung von gefärbten und nicht gefärbten Präparaten.

Im Allgemeinen empfiehlt es sich, zuerst von den an der Impfnadel haften gebliebenen Bakterien ein Deckglaspräparat zu machen. Zu dem Zwecke bringt man ein sehr kleines Tröpfchen Wasser auf ein Deckgläschen und streicht die Nadel darin ab, verreibt, lässt lufttrocken werden, erhitzt, lässt einige Tropfen Farbflüssigkeit wenige Secunden bis mehrere Minuten einwirken, spült ab, bringt das Präparat mit einem kleinen Tropfen Wasser auf den Objectträger und mikroskopirt. Wir erinnern nochmals daran, dass gefärbte Präparate mit schwachem Ocular, Oelimmersionssystem und unter voller Beleuchtung, also mit Anwendung des Abbe'schen Beleuchtungsapparates, untersucht werden müssen.

Es ist anzurathen, mit verschiedenen Lösungen zu färben, um die grössere oder geringere Affinität des Mikroorganismus zu dem einen oder anderen Farbstoff herauszufinden.

Zur Differentialdiagnose eignet sich in manchen Fällen recht gut die von Gram angegebene Methode. Man lässt das Deckgläschen nach der gewöhnlichen Vorbehandlung eine bis drei Minuten auf der Anilingentianaviolettlösung (s. Seite 657) schwimmen, bringt es alsdann für einige Secunden in Jodjodkaliumlösung und schliesslich bis gerade zur Entfärbung in absoluten Alkohol. Einige Bakterien behalten die Farbe bei dieser Behandlung, andere nicht. So verlieren z. B. die Typhus- und Cholerabacillen den Farbstoff. Bacillen also, welche in der Colonie und in den auf gewöhnliche Weise gefärbten Präparaten den Typhuserregern

gleichen, sind sicher keine Typhusbacillen, wenn sie sich nach der Gram'schen Methode gut färben. Die Methode will geübt sein; als Versuchsobjecte sind junge Milzbrandbacillen zu empfehlen.

Mit einer anderen Probe der zu prüfenden Colonie wird ein hohl geschliffener Objectträger beschickt. Man bringt ein linsengrosses Tröpfchen sterilisirter Bouillon mit einer grossen Platinöse auf das Deckgläschen und impft dasselbe mit einer Spur der betreffenden Colonie; dann umgiebt man den Hohlschliff des Objectträgers mit einer Schicht Vaselin und legt auf diese das Deckgläschen, so zwar, dass in dem dadurch hergestellten abgeschlossenen Hohlraum der Tropfen frei hängt, ohne den Rand oder den Boden des Hohlschliffes zu berühren. Der Vaselinverschluss der Zelle muss absolut luftdicht sein, damit das Verdunsten des geimpften Bouillontröpfchens verhindert werde. Den Objectträger bringt man in einen Raum, dessen Temperatur ungefähr 22° beträgt und beobachtet nach einiger Zeit die Entwickelung der Bakterien, ihre Form, Bewegung, Lagerung u. s. f. Die Untersuchung findet statt unter Anwendung eines schwachen Oculars, der Oelimmersion, und unter Einschaltung einer mittelweiten Blende.

Von den Colonien, welche man für pathogen hält, muss man ausserdem die in den Tabellen Seite 717 angegebenen Culturen anlegen. Ferner empfiehlt es sich, anfänglich alle im Wasser vorkommenden Arten von Mikroorganismen so zu behandeln, theils um die nothwendige Uebung zu erlangen, theils um die gewöhnlich auftretenden Bakterien und ihre Eigenschaften kennen zu lernen; hierdurch wird das Auffinden und Erkennen der pathogenen Bakterien wesentlich erleichtert.

2. Die Stichcultur.

Der Pfropfen eines feste Nährgelatine oder Nähragar enthaltenden Röhrchens wird losgedreht, herausgezogen und zwischen Zeige- und Mittelfinger der linken Hand gefasst, so dass der vorher im Röhrchen befindliche Theil frei über die Rückenfläche der Finger hervorragt.

Das Röhrchen selbst wird so zwischen Daumen und Zeigefinger gehalten, dass die Mündung nach unten und zur Hohlhand, das mit Gelatine gefüllte Ende nach oben und zur Handrückenseite gewendet ist. Durch diese Stellung wird verhütet, dass Keime aus der Luft auf die Gelatine fallen. Sodann entnimmt man mit sterilisirter Platinnadel unter dem Mikroskop eine Probe der betreffenden Colonie, sticht die Nadel ungefähr 3 cm tief in die Gelatine ein, zieht sie, ohne den Stichcanal zu erweitern, heraus,

schliesst das Röhrchen, etiquettirt und stellt es bei Seite. Ein zweites Röhrchen wird in derselben Weise beschickt.

Will man auf der Platte gefundene Bakterien weiter züchten, so geschieht das gewöhnlich in Form der Stichculturen. Alle vier bis sechs Wochen ist, um die Cultur fortzuführen, die Uebertragung einer Spur von der alten Stichcultur in ein neues Röhrchen erforderlich, man hat die Cultur „umzustechen".

Alle Culturen müssen dunkel aufgehoben werden.

3. Die Plattencultur in Nährgelatine.

Man verflüssigt die Nährgelatine, welche in einem Reagensröhrchen enthalten ist, bei höchstens 37°, dreht den Pfropfen los, entfernt ihn und nimmt ihn, wie unter 2 beschrieben, zwischen Zeige- und Mittelfinger; das Röhrchen wird in diesem Falle so zwischen linken Daumen und Zeigefinger gefasst, dass die Oeffnung zur Hohlhandseite und etwas nach oben, das untere Ende aber zum Handrücken und etwas nach unten gerichtet ist. Dann entnimmt man mit dem Platindraht eine Probe aus der verdächtigen oder fraglichen Colonie der ursprünglichen Platte oder aus der Stichcultur etc. und impft, indem man die Nadel in der Gelatine an der Wand des Gläschens abreibt. Nachdem man letzteres durch den Wattepfropfen wieder geschlossen hat, werden durch langsames Senken und Heben die Bakterien in der Gelatine vertheilt. Da in das Röhrchen unter Umständen Hunderttausende von Keimen übertragen werden, können auf der Platte so viele Colonien entstehen, dass sie sich im Wachsthum behindern und daher ihre charakteristischen Eigenschaften nicht voll entwickeln.

Hierdurch würde die Erkennung der Artmerkmale in Frage gestellt werden.

Um das zu verhüten, inficirt man von dem ersten Röhrchen ein zweites in folgender Weise:

Man dreht den Pfropfen des bereits inficirten und des zu impfenden Gläschens los, nimmt das inficirte Röhrchen zwischen Daumen und Zeigefinger der linken Hand, so dass die Oeffnung zur Hohlhand und etwas nach oben, das geschlossene Ende zum Handrücken und etwas nach unten sieht, legt zwischen dieselben Finger und neben das erwähnte Reagensröhrchen das zu impfende Röhrchen, entfernt zuerst den Pfropfen des letzteren und fasst ihn mit Zeige- und Mittelfinger der linken Hand, entfernt darauf den Pfropfen des geimpften Gläschens, bringt diesen zwischen den vierten und fünften Finger und überträgt mit der sterilisirten

Platinöse einige minimale Tröpfchen aus dem ersten in das zweite Röhrchen, die Oese jedesmal in der Gelatine an der Wand abreibend.

Die Gläschen werden mit den entsprechenden Pfropfen geschlossen, und durch Heben und Senken die weniger zahlreichen Keime des zweiten Röhrchens in der Nährgelatine vertheilt.

Man thut immer gut, von dem zweiten Röhrchen noch ein drittes in derselben Weise zu impfen, da auch in dem zweiten Röhrchen noch zu viel Keime enthalten sein können.

Giesst man darauf die Gelatine der drei Röhrchen auf Platten aus, so werden sich auf einer derselben die Colonien in passender Vertheilung finden. Von einer gut entwickelten Colonie wird dann ein Deckgläschenpräparat gefertigt und nachgesehen, ob nur eine, und zwar die gewünschte Bakterienart vorhanden ist. Im zutreffenden Falle entnimmt man derselben Colonie eine zweite Probe zu einer Stichcultur und darf nunmehr erwarten, in dieser eine Reincultur des betreffenden Organismus zu haben. Zeigen sich die Colonien nicht charakteristisch, oder ergiebt das Deckgläschenpräparat die Anwesenheit verschiedener Bakterien, so muss das Plattenverfahren so lange wiederholt werden, bis die verschiedenen Organismen getrennt, also rein gezüchtet sind.

Selbstverständlich kann man auch hier statt der Platten Schalen oder Rollröhrchen verwenden.

4. Die Plattencultur in Agar-Gallerte.

Man fertigt dieselben genau in derselben Weise an wie die Gelatinecultur, benutzt indessen mit Vortheil flache Schalen anstatt der Platten.

Die Agarculturen legt man hauptsächlich an, um bei Brutwärme zu züchten, wo gemeiniglich ein viel rascheres Wachsthum stattfindet als bei Zimmertemperatur.

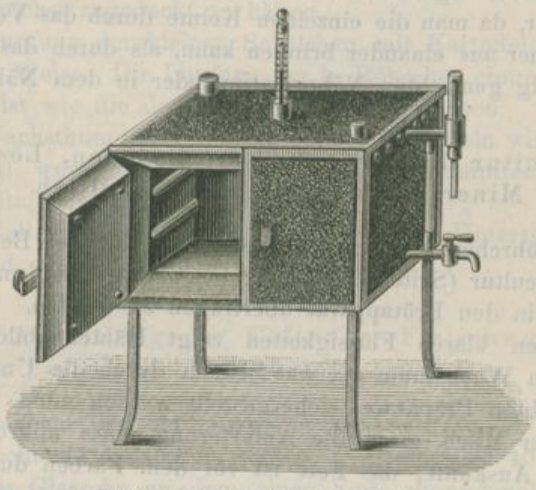
Man bringt dieselben daher in den in Fig. 39 abgebildeten Thermostaten, d. h. einen Blechkasten mit Doppelwandungen, zwischen welchen sich Wasser befindet, dessen Temperatur mittelst eines Thermoregulators constant auf 37° gehalten wird.

Das Agar scheidet, wenn es auf Platten oder in Schalen ausgegossen ist, Wasser aus, wodurch die oberflächlich liegenden Bakterien fortgeschwemmt, die Colonien vermengt werden können. Um das zu verhindern, thut man gut, die Agarschalen einige Stunden ungedeckt in dem Brütapparate, welcher allerdings staubfrei sein muss, stehen zu lassen, damit das Wasser rasch verdunstet

(Schiller). Andererseits trocknet das Agar in den geimpften Schalen im Brütapparate leicht aus, wenn sie länger als 24 Stunden darin stehen. Um diesen Uebelstand zu beschränken, stellt man die Schalen so in den Apparat, dass die Oberschale nach unten, die Unterschale nach oben kommt, bei welcher Anordnung dann die Agarschicht unter der Decke hängt.

Um die in der Tiefe des Agars befindlichen kleinen Colonien zugängig zu machen, sticht man mit der feinsten Platinnadel die Colonie unter Führung des Mikroskops an und zerspaltet sie sowie die überlagernde Gallertschicht. In den Spalt dringen die im

Fig. 39.



Brütapparat oder Vegetationskasten.

Agar eingeschlossene Flüssigkeit und die Bakterien der aufgeschlitzten Colonie hinein und werden von dort mit der feinsten Platindrahtöse entnommen.

Wie die Agarcultur bei Verdacht auf Cholera anzulegen ist, wolle man im nächsten Capitel nachsehen.

5. Die Cultur auf schrägem Agar und auf Blutserum.

Es empfiehlt sich, dazu möglichst reines Aussaatmaterial zu verwenden. Das Röhrchen mit schräg erstarrtem Nähragar oder Blutserum wird geöffnet und mit der Oeffnung zur Hohlhand, mit dem Boden zur Handrückenseite hin so zwischen Daumen und Zeigefinger gehalten, dass man von oben her auf die Fläche des

Nährmaterials sieht und das Condenswasser nicht über die Fläche läuft. Dann wird die mit der Cultur armirte Oese über die Mitte der geraden Fläche geführt, ohne sie indessen in das Condenswasser einzutauchen. Das so aufgebrachte Material wird von der Mitte aus nach rechts und links verstrichen.

Die Röhrchen kommen in den Brütapparat.

Soll von einer auf schräg erstarrtem Agar oder Blutserum gewachsenen Cultur etwas entnommen werden, so bietet der Rand der Cultur, weil dort die jüngsten und kräftigsten Bacillen liegen, die Entnahmestelle.

Zur Trennung verschiedenartiger Spaltpilze eignet sich das schräg erstarrte Agar und das Blutserum weniger gut als die Plattencultur, da man die einzelnen Keime durch das Verstreichen nicht so sicher aus einander bringen kann, als durch das Schütteln in der flüssig gemachten Nährgelatine oder in dem Nähragar.

6. Die Cultur in Peptonwasser, Bouillon, Lösung von Mineralverbindungen und in Milch.

Das Röhrchen wird in der Weise, wie bei der Beschreibung der Plattencultur (Seite 693) angegeben ist, gefasst und geimpft, um darauf in den Brütapparat übertragen zu werden.

Bei den klaren Flüssigkeiten zeigt Häutchenbildung oder Trübwerden Wachsthum an, was jedoch durch die Untersuchung eines gefärbten Präparates sichergestellt werden muss.

Bei der Milch giebt die Anfertigung eines mikroskopischen Präparates Auskunft; das Fett ist vor dem Färben durch Aether zu entfernen; sehr störend sind die nicht ganz fern zu haltenden Caseïngerinnungen; man färbt am besten mit Victoriablau. Bakterien, welche grössere Mengen Säure bilden, bringen die Milch, wenn auch öfter Tage darüber vergehen, zur Gerinnung (Bakt. coli im Gegensatz zum Typhus).

Ob die eingesäeten Mikroben rein geblieben sind, oder wie gross die Entwickelung ist, wird nach kräftigem Umschütteln durch Anlegung von Plattenculturen erwiesen.

7. Die Cultur auf Kartoffeln.

Die Zubereitung der Kartoffeln ist Seite 663 beschrieben. Zum Impfen umfasst man mit den in Sublimatlösung gewaschenen Fingern der linken Hand die eine Kartoffelhälfte — die Glocke wird vorher mit der rechten Hand abgenommen —, bringt mit der

Platinnadel das Impfmaterial auf die Mitte der Schnittfläche und verstreicht es mit einem sterilisirten und wieder abgekühlten kleinen Messer, so dass eine Randzone von 1 cm Breite frei bleibt.

Um Kartoffelculturen frei von Verunreinigungen zu halten, ist einige Uebung und grosse Sorgfalt nöthig; man merke sich, dass die rechte Hand die Arbeitshand ist, während die linke, immer sorgfältig mit 1 pro Mille Sublimatlösung befeuchtet, nur zum Anfassen der Kartoffel benutzt werden darf. Jedes Durchschneiden einer Kartoffel erfordert ein unmittelbar vorher sterilisirtes Küchenmesser, jede Impfung einer Kartoffelhälfte ein ebenfalls frisch sterilisirtes, abgekühltes kleines Messer. Die durchschnittenen Kartoffeln sind, um das Auffallen von Keimen aus der Luft zu verhüten, möglichst zugedeckt zu halten.

Die Impfung der kleinen Schälchen mit Kartoffeln geschieht in analoger Weise. Die Impfung der in Röhrchen eingeschlossenen Kartoffeln ist wie die des Blutserums zu handhaben.

Das Wachsthum der Culturen auf den Kartoffeln wird meistens beschleunigt, wenn man die Glocke mit den geimpften Kartoffeln in den Brütapparat (Fig. 39) bringt.

Die Cultur auf Kartoffeln findet bei der Untersuchung auf Typhus und event. auf Cholera Verwendung.

8. Die Anstellung der Cultur in Fleischwasser in U-Röhren.

Sie dient zur Typhusbestimmung. Sofern Pasteur'sche Gährkölbchen nicht zur Verfügung stehen, wird ein etwa 40 cm langes, 8 mm weites Glasrohr an dem einen Ende zugeschmolzen und in der Mitte zu einem Winkel von 45° gebogen, dann wird der geschlossene Schenkel vollständig, der offene etwa 10 cm hoch mit Fleischwasser (siehe Seite 656) gefüllt und das Rohr so in den Dampfapparat gelegt, dass das offene Ende des Rohres den höchsten Punkt einnimmt. In dieser Lage wird $^1/_2$ bis $^3/_4$ Stunden sterilisirt. Nach der Abkühlung wird von der zu untersuchenden Colonie oder Cultur eine geringe Menge in keimfreiem Fleischwasser aufgeschwemmt und mittelst sterilisirten, engen Glasrohres in den geschlossenen Schenkel des U-Rohres übertragen, worauf die Ueberführung in den Brütapparat erfolgt.

Während die Typhusbacillen kein Gas bilden, entwickeln die Darmbakterien Gas, oft allerdings in so geringen Mengen, dass einige Tage vergehen, ehe sich eine Blase in der Kuppe des geschlossenen Schenkels angesammelt hat.

9. Das Ueberschütten der Culturen

dient gleichfalls zur Feststellung der Typhusbacillen.

In Traubenzuckergallerte entwickelt der Typhusbacillus kein Gas, wohl aber thun das die Colibacillen.

Man verflüssigt Traubenzuckeragar, lässt bis auf 40° abkühlen, giebt von der verdächtigen Cultur hinein, schüttelt vorsichtig um und lässt erstarren. Auf das erstarrte Agar wird dann der Inhalt eines zweiten Röhrchens gegossen. Das Röhrchen mit dem erstarrten Agargehalt wird dem Brütapparat übergeben. Das gebildete Gas zerklüftet den Agar.

10. Das Impfen der Kölbchen mit Fleisch

geschieht in der Weise, dass mit einer Platinnadel oder einer Oese etwas von der fraglichen Cultur genommen und durch Tupfen auf verschiedene Stellen des Fleischbreies übertragen wird. Die geimpften Kölbchen kommen in den Brütapparat. Entwickelt sich übler Geruch, so ist durch die Plattencultur die Reinheit der Einsaat und damit der Beweis zu erbringen, dass wirklich die eingeimpfte Bakterienart die Zersetzung bewirkt hat.

11. Die Indol- und die Nitrosoindol-Reaction.

Die Cholerabacillen bilden in Peptonkochsalzwasser (S. 661) bei Brutwärme schon in 6 bis 10 Stunden sowohl Indol als auch aus den Spuren vorhandener Nitrate salpetrige Säure.

Durch Zusatz von 1 ccm verdünnter Schwefelsäure (1 : 4), welche ganz frei von salpetriger Säure sein muss, zu etwa 10 ccm der Cultur entsteht die Reaction, welche sich in einer Rosafärbung ausspricht.

Der Typhusbacillus bildet weder Indol noch salpetrige Säure. Die Darmbakterien indessen erzeugen Indol. Setzt man zu 10 ccm Cultur einer fraglichen Colonie in Peptonkochsalzwasser, welche mindestens 48 Stunden im Brütapparat gestanden hat, 1 ccm einer Lösung von 0,02 Proc. Kaliumnitrit und fügt darauf 1 ccm verdünnter Schwefelsäure hinzu, so spricht das Auftreten der Rosafärbung gegen Typhus und für Bakt. coli.

12. Cultur auf Lackmusmolke.

Zum Gebrauch werden ungefähr 50 ccm Molke mit einer entsprechenden Menge (s. S. 666) Lackmuslösung zusammengeschüttet und hiervon je 10 ccm in Reagircylinder gegeben, sterilisirt und

mit einer echten Typhus-, echten Bakt. coli- und der fraglichen Cultur geimpft und darauf dem Brütapparat übergeben.

Nach 24 Stunden lässt die Typhuscultur einen Stich ins Röthliche, die Colicultur bereits deutliche Rothfärbung erkennen. Nach zehn Tagen Bebrütung wird mit $^1/_{10}$ Normalnatronlauge (4 g NaHO in 1 Liter H_2O) titrirt bis zur Neutralität. Die verbrauchten Zehntel Cubikcentimeter Titrirflüssigkeit geben den Gehalt an Säure in Procenten an, sind also zur Neutralisation von 10 ccm Nährmolke 0,2 ccm $^1/_{10}$ Normalnatronlauge verwendet, so entspricht das 2 Proc. $^1/_{10}$ Normalsäure.

13. Das Thierexperiment.

In der Regel genügen die bei den bisher erläuterten Verfahren hervortretenden Eigenschaften, um die Mikroorganismen zu charakterisiren und zu erkennen, so dass man bei Wasseruntersuchungen nur selten auf das Thierexperiment zurückzugreifen hat. Wir beschränken uns darauf, zwei Methoden der Impfung anzugeben, von welchen die erstere bei Choleraverdacht Verwendung finden kann.

1. Die Injection. Man vollzieht sie zweckmässig vermittelst einer Koch'schen oder Pravaz'schen Spritze. Die Sterilisirung derselben ist bereits Seite 655 erwähnt. Der Stempel der Pravaz'schen Spritze wird nach Löffler's Vorschlag am besten aus Asbestwolle gefertigt, welche durch Erhitzen nicht leidet. Undicht gewordene Stempel sind durch Ansaugen von sterilisirtem Wasser zum Aufquellen zu bringen.

Das Impfmaterial wird in einem sterilisirten Uhrschälchen mit sterilisirtem Wasser oder Bouillon verrieben, in die Spritze eingesogen, die Impfstelle der Haare entledigt und mit Sublimatlösung abgewaschen. Nachdem die Canüle bis zu der gewünschten Tiefe vorgestossen ist, spritzt man die Flüssigkeit langsam ein. Auf diese Weise kann man unter die Haut, in die Muskeln, in die Brusthöhle, in die Bauchhöhle, in eine Vene, in ein Gelenk hinein die Injection machen.

Für die Choleradiagnose wird die Injection in folgender Weise ausgeführt: Von einer etwa 18 Stunden alten Choleracultur bezw. einer Cultur, welche man für Cholera hält, wird mit einer Platinöse etwa $1^1/_2$ bis 2 mg entnommen, in 1 ccm Bouillon verrieben und einem Meerschweinchen, wie nachstehend beschrieben, in die Bauchhöhle injicirt. In der linken Unterbauchgegend werden die Haare entfernt, die Haut wird mit

Sublimat abgewaschen, dann wird die Nadel der Spritze ungefähr einen Querfingerbreit über der Schenkelfalte zuerst durch die Haut und dann durch die Muskulatur gestochen, welche dem Einstich erheblich weniger Widerstand entgegensetzt als die Haut. Wenn die Nadel ungefähr 1 cm tief eingestochen ist, wird durch leichtes Hin- und Herbewegen des oberen Theiles geprobt, ob die Spitze frei ist. Darauf wird die gefüllte Spritze aufgesetzt und nun erfolgt die Injection. Vorher wird das Gewicht und die Temperatur des Thieres bestimmt, letztere durch Messung im After. Einige Stunden nach der Einspritzung wird das Thier auffällig ruhig, fühlt sich schlaff an; schon jetzt macht sich starke Muskelschwäche bemerkbar, die Körperwärme beginnt zu sinken. Das Thier liegt auf der Seite oder platt auf dem Bauche, unfähig, sich wieder aufzurichten; die Hinterextremitäten sind wie gelähmt, von Zeit zu Zeit durchlaufen fibrilläre Zuckungen den Körper. Das Thier fühlt sich kalt an, und mit einer Temperaturerniedrigung bis weit unter 30° C. stirbt es im Laufe von ungefähr 24 Stunden. Der Befund bei der Obduction ist gering. Das Bauchfell und die Därme sind etwas geröthet, in der Bauchhöhle findet sich eine geringe Menge gelblicher bis röthlicher Flüssigkeit, die oft die Cholerabacillen in grosser, oft aber auch in nur geringer Zahl enthält. Die Leber, Milz sind schlaff, die Lungen und das Herz mit Blut erfüllt.

Zu diesen Versuchen sind nur Meerschweinchen verwendbar. Die Leichen der Thiere sind zu verbrennen.

2. Die subcutane Impfung. Um diese Art der Infection auszuführen, werden die Haare an der zu impfenden Stelle kurz abgeschnitten, die Haut wird mit Sublimatlösung gewaschen und vermittelst sterilisirter Watte abgetrocknet. Alsdann fasst man mit sterilisirter Pincette eine Hautfalte und durchschneidet dieselbe mittelst keimfrei gemachter Scheere. In die so entstandene Wunde schiebt man eine vorher geglühte und wieder abgekühlte starke Platinnadel oder Platinöse ein und bildet durch Trennung des Unterhautgewebes eine Tasche, in welche mit der Platinöse der Impfstoff übertragen wird.

Man führe, um den pathogenen Charakter eines Mikroorganismus festzustellen, zuerst viel Material und, wenn dasselbe tödtet, bei den folgenden Versuchen weniger ein. Als Versuchsthiere eignen sich in erster Linie weisse Mäuse, Meerschweinchen, Kaninchen und Hühner. Die Thiere, welche in Folge der Impfung gestorben sind, werden verbrannt. Auf sorgfältige Desinfection der Abgänge ist zu achten.

D. Der Nachweis der pathogenen Mikroorganismen im Wasser.

a) Typhus.

Die Erreger des Typhus gehören zu einer grösseren Gruppe von Bakterien, welche unter sich viele Aehnlichkeit haben, so dass es schwer hält, die einzelnen Arten sicher von einander zu unterscheiden.

Auf den Platten mit Nährgelatine wachsen die Typhusbacillen nicht in charakteristischer Weise. Früher glaubte man ein sicheres Unterscheidungsmerkmal in der Cultur auf gekochten Kartoffeln zu haben; die Typhusbacillen sollten dort in Gestalt eines fast unsichtbaren, glatten, glänzenden Häutchens wachsen, die verwandten Bacillen jedoch als dicke, theils grauweisse, theils gelbliche oder graubraune Beläge. Es giebt indessen Kartoffeln, auf welchen die Typhusbacillen wie die verwandten Arten, und wieder andere, wo diese wie Typhus wachsen.

Zur Zeit ist man nur dann berechtigt, die Diagnose „Typhusbacillen" zu stellen, wenn alle in der dem Schlusse dieses Capitels angehängten Tabelle verzeichneten Merkmale vorhanden sind.

Remy und Sugg[1]) haben in einer vorzüglichen experimentellen und kritischen Arbeit, auf welche wir uns nach entsprechender Nachprüfung zum Theil stützen, gezeigt, dass 14 Culturen von Typhusbacillen verschiedenster Herkunft stets alle die in der Tabelle verzeichneten Eigenschaften aufwiesen, während von 33 verwandten Mikroben zwar manche eine Anzahl, aber keiner alle Merkmale besass.

Am verwandtesten sind den Typhusbacillen die Darmbakterien und unter ihnen das Bakterium coli commune. Es unterliegt indessen keinem Zweifel, dass zur Zeit unter der Bezeichnung Bakt. coli com. Escherich mehrere eng verwandte Arten oder Varietäten zusammengefasst werden, welche unter sich in den Hauptzügen gleich sind, aber doch gewisse Verschiedenheiten bieten.

Um die Verwechselung des Typhusbacillus mit den Kothbacillen möglichst zu vermeiden, sind in der Tabelle die Merkmale beider neben einander gestellt, wobei indessen zu berücksichtigen ist, dass wegen der Unsicherheit des Begriffes Bakterium coli commune geringe Abweichungen von den hierfür angegebenen Merkmalen im concreten Falle vorkommen können.

---

[1]) Recherches sur le bacille d'Eberth-Gaffky, Tom. I. Caractères distinctifs du bacille de la fièvre typhoïde. Gand 1893.

Weil auf den Gelatineplatten, welche bis jetzt noch den Ausgangspunkt für die Untersuchung darstellen, sehr viele Bakterien ähnlich wie die Typhusbacillen wachsen und weil es fast unmöglich ist, bei grösserem Gehalt eines Wassers an Mikroorganismen alle verdächtigen Colonien abzustechen und zu färben oder die ganze Reihe der Culturversuche anzustellen, und weil andererseits das Streben dahin gehen muss, eine möglichst grosse Menge Wassers zu untersuchen, so hat man Methoden ersonnen, um die Zahl der Saprophyten gegenüber den Typhusbacillen herabzudrücken.

Von Chantemesse und Widal[1]) ist angegeben worden, man solle der Nährgelatine, zu welcher die Wasserprobe gesetzt wird, 0,25 Proc. Carbolsäure zugeben, dann würden die übrigen Bakterien in ihrer überwiegenden Mehrheit nicht mehr, die Typhusbacillen aber noch gut zum Wachsthum kommen. Nachprüfungen von Holz[2]) haben gezeigt, dass bereits 0,2 Proc. Carbolsäure die Entwickelung der Typhuscolonien in Rollröhrchen intensiv behindert, auf Platten indessen nicht, während wirklich die Saprophyten und besonders die verflüssigenden abgetödtet oder erheblich in ihrem Wachsthum beschränkt werden. Auch uns erwies sich ein Zusatz von 0,2 Proc. Carbolsäure dienlich; die Saprophyten wurden erheblich zurückgehalten, die Typhusbacillen hingegen nur wenig behindert. Andere Autoren, Kitasato, Ravitsch-Stcherba, Holz, Dunbar, Katz, Lösener, verwerfen indessen diese Methode.

Thoinot setzte zu $^1/_2$ Liter des zu untersuchenden Wassers 20 Tropfen reiner Carbolsäure und liess mehrere Stunden stehen; dadurch wurde die Entwickelung einer Anzahl gewöhnlicher Bakterien auf den damit angesetzten Gelatineplatten verhindert, die Entwickelung der Typhusbacillen aber nicht beeinflusst.

Auffälliger Weise erhielt Holz bei der Nachprüfung nicht sich deckende Resultate, insofern als die Gelatineplatten, welche aus einem stark bakterienhaltigen Grabenwasser angesetzt waren, sehr rasch verflüssigt wurden, während aus Brunnen- und Leitungswasser nur wenig Colonien auf den Platten wuchsen. Typhusbacillen zu Leitungs-, Brunnen- und Grabenwasser gesetzt und drei bis fünf Stunden mit 0,25 Proc. Carbolsäure stehen gelassen, wuchsen nicht aus dem ersteren, wohl aber aus den beiden letzteren.

Wir hatten folgendes Resultat:

[1]) Gazette des hôpitaux 1887, p. 202.
[2]) Zeitschr. f. Hygiene u. Inf. 8, 773.

Nach Zusatz von 0,2 Proc. Carbolsäure und dreistündiger Einwirkung auf Saalewasser war die Gesammtzahl der Bakterien von 2100 mit 118 verflüssigenden auf 1155 mit 46 verflüssigenden gesunken; bei fünfstündiger Einwirkung waren die Keimzahlen auf $^1/_{10}$ reducirt. Bei Zusatz von 0,25 Proc. Carbol waren schon nach drei Stunden die Platten fast völlig frei von fremden Colonien, die Zahl der eingebrachten Typhusbacillen hatte sich gegenüber der Controle etwas vermindert; ihr Wachsthum auf den Platten war nicht behindert. Die Plattenculturen, aus Wasser mit Carbolzusatz, liessen sich erheblich leichter und besser untersuchen als die Controlplatten, die nicht mit Carbolsäure vorbehandelt waren. Einen Unterschied in der Entwickelung der Typhuscolonien bei Einwirkung von 0,25 oder 0,2 Proc. Carbol konnten wir nicht constatiren. Dem entgegen hatte Lösener[1]) mit demselben, nur etwas modificirten Verfahren ungünstige Resultate.

Parietti[2]) löst 5 g Carbolsäure und 4 g Salzsäure in 100 g destillirten Wassers, giebt hiervon 0,1, 0,2, 0,3 ccm zu je 10 ccm neutraler Bouillon, fügt jedem Röhrchen 1 ccm des zu untersuchenden Wassers hinzu und setzt die Gläser in den Brütapparat. Tritt nach 24 Stunden eine leichte Trübung ein, so soll diese auf Typhus deuten, die Bacillen sind dann durch das Plattenverfahren zu isoliren.

Kamen gelang es unter Anwendung dieser Methode, in zehn Reagensröhrchen alle Bakterien bis auf fünf Arten zurückzudrängen, wovon eine zweifellos Typhus war.

Unsere Resultate waren nicht günstig, bei stärkerem Zusatz, 0,3 ccm und 0,2 ccm, wuchsen Typhusbacillen nicht, und bei 0,1 Proc. gediehen noch so viel verflüssigende Bakterien, dass es schwer war, die Typhuscolonien früh genug heraus zu fischen. Gleich ungünstige Resultate werden von Lösener angegeben.

Die Methode von Vincent ist älter als die von Parietti, aber ihr ähnlich. Vincent setzt zu 10 ccm neutraler Nährbouillon fünf Tropfen reiner fünfprocentiger Carbolsäure und hält die mit 1 ccm Wasser beschickten Gläschen bei 42°, während sich die Methode von Péré[3]) dadurch unterscheidet, dass die Gläschen bei 34° gehalten werden.

---

[1]) Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt 11, 207. Ueber das Vorkommen von Bakterien mit den Eigenschaften der Typhusbacillen in unserer Umgebung ohne nachweisbare Beziehungen zu Typhuserkrankungen nebst Beiträgen zur bakteriologischen Diagnose des Typhusbacillus.

[2]) Ref. Hygienische Rundschau I. 337.

[3]) Ann. de l'Inst. Pasteur, 5, 86.

Ravitsch-Stcherba[1]) setzt 0,1 pro Mille α-Naphtol dem Nährboden hinzu; dann sollen die gewöhnlichen Wasserbakterien nicht mehr, die Typhusbacillen aber noch wachsen, deren Entwickelung erst bei 0,2 pro Mille aufhöre.

Lösener erhielt mit diesem Verfahren nicht sehr befriedigende Resultate, die oberflächlichen Typhuscolonien waren grünlich schimmernd, stark gezeichnet, in der Mitte etwas erhaben, also nicht leicht als solche erkenntlich; das Bakt. coli wuchs in Kuppenform.

Holz[2]) ging bei seinen Untersuchungen von der Thatsache aus, dass das Wachsthum auf der Kartoffel die Typhusdiagnose wesentlich erleichert. Er zerrieb rohe, geschälte Kartoffeln auf einem Reibeisen und presste den entstandenen Brei durch ein Tuch. Das Filtrat wurde $^1/_2$ Stunde im Dampftopf gekocht und nach dem Absetzen durch Papier filtrirt, dann mit 10 Proc. Gelatine versetzt, sterilisirt, in Reagensgläser gefüllt und abermals sterilisirt. Die so entstandene bräunliche, ziemlich klare „Kartoffelgelatine" bedurfte ungefähr 2,6 bis 3,2 ccm Normalalkali zu ihrer Neutralisation.

Auf den aus Kartoffelgelatine gefertigten Platten wachsen die Typhusbacillen etwas langsamer als auf gewöhnlicher Nährgelatine; die tiefliegenden Colonien erscheinen als runde oder ovale, zunächst stark lichtbrechende, gekörnte, später dunkle bis braungrün gefärbte Kugeln. Die von Lösener erwähnte Zopf- oder Borstenbildung hat nichts mit der „Kartoffelgelatine" zu thun; die Ausbildung der Typhuscolonien zu Formen, welche Citronen ähnlich sehen und häufig zopf- oder borstenartige Ausläufer zeigen, wird vielmehr hauptsächlich durch die grosse Weichheit der Gelatine bei raschem Wachsthum der Colonien bedingt. Die oberflächlichen Colonien haben recht stark ausgebuchtete Ränder, sind gefaltet und stark lichtbrechend. Beide Arten von Typhuscolonien bleiben entschieden kleiner als die entsprechenden Colonien auf den Platten mit gewöhnlicher Nährgelatine. Die gewöhnlichen Mikroorganismen des Wassers kommen grösstentheils auf der Kartoffelgelatine nicht oder schlecht fort, besonders werden die verflüssigenden Mikroben behindert, so dass die Platten mehrere Tage länger erhalten bleiben als sonst, dahingegen wachsen die Schimmel vorzüglich auf der Kartoffelgelatine. Holz setzt daher, wenn er Schimmel in grösserer Zahl fürchtet, 0,05 Proc. Carbolsäure der

[1]) Zur Frage des Nachweises der Typhusbacillen in Wasser und Fäces. Ref. hygienische Rundschau 1893, S. 392.

[2]) Zeitschr. f. Hygiene 8, 143.

Kartoffelgelatine hinzu. Wir möchten nicht zu dem Carbolzusatz rathen. Ein rasches Abstechen der „verdächtigen“ Colonien hilft über die Schwierigkeit hinweg.

Die Methode von Holz ist von mehreren Seiten abfällig beurtheilt worden. Wir können dem nicht beistimmen. Unsere Versuche haben gute Resultate ergeben, indessen kamen auf den Kartoffelgelatineplatten etwas weniger Typhuscolonien zur Entwickelung als auf den Controlplatten, wenn auch der Unterschied nicht gross war.

Uffelmann[1]) versetzte früher die gewöhnliche, schwach alkalische Fleischwasserpeptongelatine mit Citronensäure und Methylviolett. Dunbar's[2]) Versuch ebenso wie unsere Nachprüfungen hatten ein geradezu schlechtes Resultat.

Später versetzte Uffelmann[3]) die genau neutralisirte Gelatine mit 0,1 Proc. reiner Carbolsäure und 0,002 Proc. Methylviolett (gelöst in 1 ccm Alkohol und 2 ccm Wasser). In dieser Gelatine sollen die Typhusbacillen charakteristisch wachsen und sollen die Colonien nach zwei Tagen den Farbstoff kräftig aufnehmen, so dass sie nach zwei weiteren Tagen erheblich blauer sind als die Umgebung. Die übrigen Bakterien, mit Ausnahme des Bact. coli comm., sollen diese Eigenschaft nicht zeigen. Günstige Resultate sind auch mit diesem Verfahren nicht erreicht worden.

Alle die erwähnten Methoden verfolgen den Zweck, den Typhusbacillen gegenüber den anderen Mikroorganismen bessere Chancen der Entwickelung zu geben durch Verabreichung eines leicht sauren Nährmaterials, gegen welches die meisten übrigen die Gelatine fest lassenden Bakterien durch sehr mangelhaftes Wachsthum, die den Leim der Nährgelatine peptonisirenden durch verlangsamte Verflüssigung reagiren. Jedoch kommen nach beiden Richtungen hin Ausnahmen vor; besonders wachsen einzelne Bakterienarten und darunter das Bact. coli commune besser auf saurem Nährboden als der Typhusbacillus. Desshalb verwirft z. B. Dunbar alle diese Methoden, was indessen viel zu weit gegangen ist.

Sind in einem Wasser 100 Colibacillen und 10 Typhusbacillen enthalten, so gelingt es zweifellos eher, eine Typhuscolonie zu finden, wenn beide Arten allein oder mit wenigen anderen Mi-

---

[1]) Ueber den Nachweis des Typhus. Berl. Klin. Wochenschrift 1891, Nr. 35, S. 857.

[2]) Untersuchungen über den Typhusbacillus und den Bac. coli comm. Zeitschrift f. Hygiene und Infectionskrankheiten 12, 500.

[3]) Versuche über die Widerstandsfähigkeit der Typhusbacillen gegen Trocknung u. s. w. Centralbl. f. Bakt. und Parasitenkunde 15, 133.

kroben auf den Platten gewachsen sind, als wenn ausserdem noch ein oder mehrere Tausend andere Colonien und darunter verflüssigende sich entwickelt haben. Wächst neben dem Typhus auch der Colibacillus auf den Platten, so dienen die in der Tabelle aufgeführten, differential-diagnostischen Merkmale zur Trennung dieser beiden, dazu ist das saure Nährmaterial nicht geeignet. Zuweilen ist es an und für sich schon wichtig, das Bacterium coli nachgewiesen zu haben. Weitere Vortheile der erwähnten gegenüber der gewöhnlichen Nährgelatinemethode bestehen darin, dass mehr Wasser verwendet werden kann, weil weniger Saprophyten wachsen, dass Verflüssigungen weniger zu fürchten sind, und dass mehr Platten untersucht werden können, wenn nur 100 statt 1000 Bakterien auf der Platte vorhanden sind.

Diesen Vortheilen steht der Nachtheil gegenüber, dass auf den sauren Nährböden sicher nicht alle vorhandenen Typhusbacillen zum Wachsen kommen und die Typhuscolonien sich weniger rasch und weniger üppig und auch etwas weniger charakteristisch entwickeln; es ist daher Vorsicht und Aufmerksamkeit geboten.

Welche der verschiedenen Methoden man verwenden will, ist zur Zeit noch Sache der Liebhaberei, denn sicher arbeitet keine, und gross sind die Unterschiede anscheinend nicht, ausserdem ist eine gewöhnliche Plattencultur in Gelatine mit ihren dazu gehörenden Verdünnungen immer zu machen.

Die Sedimentirung zu Hülfe zu nehmen, ist zuerst unseres Wissens von Finkelnburg, und zwar mit Erfolg angewendet worden; die Centrifugirung, die ja weiter nichts ist als eine rasche Sedimentirung, leistet dasselbe aber in kürzerer Zeit, sie verdient daher den Vorzug vor dem gewöhnlichen Absitzenlassen. Man centrifugire mindestens eine halbe Stunde lang, und zwar möglichst kräftig.

Von Vortheil kann es sein, zwei Methoden zu combiniren, wie das unter anderen Holz gethan hat (Thoinot-Holz). In dem hygienischen Institut zu Jena wird oft zunächst die Centrifuge angewendet und dann Kartoffelgelatine benutzt, dadurch wird die Menge des Wassers, welche zur Untersuchung gelangt, wesentlich vermehrt.

Auf zwei Punkte ist noch aufmerksam zu machen: Für alle mit Carbol versetzten Nährböden eignet sich die Rollröhrchen-Methode nicht; da das Carbol nicht frei verdunsten kann, tritt eine über die gewünschte Grenze hinausgehende Behinderung des Wachsthums der Typhusbacillen ein.

Weiter hat sich uns als praktisch erwiesen, an die untere Grenze der auf den vorstehenden Seiten verzeichneten Säuregrade heranzugehen. Zwar wird dadurch die Zahl der Bakteriencolonien auf den Platten etwas grösser, aber andererseits sind die Chancen für die Entwickelung der Typhusbacillen bessere, und auf letzteres ist entschieden Rücksicht zu nehmen, da möglicherweise durch längeren Aufenthalt im Wasser die Typhusbacillen weniger lebens- und vermehrungskräftig werden. Lösener verwirft alle Methoden, er gestattet nur einen Zusatz von 0,03 bis 0,05 Proc. Carbolsäure zur Nährgelatine. Kruse[1]) lässt 0,05 bis 0,1 Proc. zu; mit letzterer Zahl können auch wir uns einverstanden erklären; übrigens kommt für die Grösse des Carbolzusatzes, als entwickelungshemmenden Principes, auch noch die mehr oder minder starke Säure bezüglich Alcalescenz der Gelatine mit in Betracht. Die Wirkung von 0,05 Proc. Carbolsäure kann durch die Wirkung der Reaction leicht paralysirt werden. Kruse verwendet zur Typhusbestimmung Nährgelatine, welche überhaupt nicht durch Zusatz von Natriumcarbonat neutralisirt ist, ein jedenfalls ungenaues Verfahren.

Nach diesen Vorbemerkungen stellt sich eine Untersuchung auf Typhus im Wasser in folgender Weise dar:

Der Entnahme muss eine genaue Besichtigung der Oertlichkeit vorhergehen, dann entnimmt man bei offenen Wässern an der Schöpfstelle zwei Proben, die eine etwa 10 bis 20 cm unter der Oberfläche, die andere an der Oberfläche, und zwar in der Nähe von Nahrungscentren, z. B. Rand des Gemäuers etc. Bei Brunnen nimmt man, um die unter günstigen Bedingungen im Rohr befindlichen Bakterien zu bekommen, die eine Probe aus dem zuerst ausfliessenden Wasser, die zweite schöpft man an den verschiedensten Stellen von der Oberfläche des Wassers mit einem reinen oder besser sterilisirten Gefäss. Geeignete Stellen sind die Wand des Brunnens oder die Umgebung des Pumpenrohres.

Ströll-Amberg hat in einen kleinen Stadtbach Beutel von Gaze hineingehängt, die an ihrer Spitze Glaswolle enthielten; nach vier Stunden hat er die Wolle herausgenommen, im Scheidetrichter abgespült und, nachdem die groben Körper durch ein Drahtsieb abgefangen waren, den Bodensatz aus dem Trichter in Gelatine entleert.

Nachdem man sich schlüssig geworden ist, welche der vorher bezeichneten Methoden man ausser der gewöhnlichen Platten-

[1]) Kritische und experimentelle Beiträge zur hygienischen Beurtheilung des Wassers. Zeitschrift f. Hygiene u. Infect. 17, 1.

cultur anwenden will, fertigt man die entsprechenden Culturen aus jeder der beiden Proben und macht ferner entsprechende Controlen mit einer Reincultur von Typhusbacillen, und mit Koth oder einer Reincultur von Bact. coli commune.

Kruse (l. c.) macht noch den Vorschlag, welcher ebenfalls neben der gewöhnlichen Plattencultur versucht werden mag, saure, d. h. nicht oder sehr schwach mit Alkali versetzte Nährgelatine in Petri'sche Schalen zu giessen, dann auf die erstarrte Gelatine 1 bis 10 bis 20 Tropfen Wasser zu träufeln und die Tropfen mit sterilisirtem Pinsel auf der Gelatine zu vertheilen, um so eine möglichst grosse Zahl von Oberflächencolonien zu erhalten, die besser auf Typhus hinweisen als die tief liegenden.

Von den auf die eine oder andere Weise hergestellten Platten werden die verdächtigen auf schrägen Agar und durch Stich in hohe Röhrchen mit Traubenzuckeragar übertragen und ebenso wie die von den Controlplatten des Typhus- und Colibacillus in gleicher Weise angefertigten Röhrchen in den Brütapparat gestellt. Ein Theil der abgestochenen verdächtigen Colonien wird auf Agar bei Brütwärme überhaupt nicht wachsen, womit der Beweis erbracht ist, dass Typhus nicht vorliegt, ein anderer Theil wird in den nächsten 24 bis 48 Stunden aus dem Traubenzucker Gas bilden, was der Typhusbacillus niemals thut.

Diejenigen Culturen, welche auf schrägem Agar und in Traubenzuckeragar ohne Gasbildung gewachsen sind, werden mikroskopisch auf ihre Form, Färbbarkeit und Beweglichkeit untersucht, dann werden Uebertragungen vorgenommen in Peptonwasserröhrchen zur Anstellung der Indolreaction, sowie in U-Röhrchen mit Fleischwasser und in Röhrchen mit sterilisirter Milch. Gerinnt die Milch nach längerer Zeit nicht, so ist ihre Reaction zu prüfen, eine leicht saure, also nicht alkalische Reaction spricht für Typhus.

Lässt sich dann Indol nicht nachweisen, tritt keine Gasentwickelung auf und gerinnt die nicht alkalische Milch nicht, so sind die übrigen Proben zu machen, Cilienfärbung, Impfung von Kartoffeln, von Lackmusmolke, von Fleischbrei und von Nährsalzlösung.

Man sorge dafür, dass man stets eine Sorte Kartoffeln vorräthig habe, auf welcher die Typhusbacillen als fast unsichtbares glänzendes Häutchen wachsen.

Alle die erwähnten Präparationen werden auch mit den gleichalterigen Agarculturen von Typhus- und Colibacillen vorgenommen.

Wegen einer Stellung der Diagnose durch Immunisirungsversuche siehe das Capitel Cholera (Seite 712).

b) Cholera.

Die Mikroorganismen der Cholera gehören den gekrümmten Bacillen an. Ist auch die Krümmung nicht immer sehr deutlich ausgesprochen, so ist sie dennoch stets vorhanden. Ausser in gefärbten Präparaten lässt sie sich sehr schön erkennen im hängenden Tropfen am Rande der Culturen, wo die Bacillen in einfacher Schicht angetrocknet sind. Sollen Kommabacillen aus Wasser als Cholerabacillen angesprochen werden, so müssen sie alle in der angehängten Tabelle aufgeführten Eigenschaften besitzen.

Früher glaubte man, die Diagnose auf Cholera sei leicht zu stellen; diese Annahme besteht noch zu Recht bei Untersuchung von Fäcalien, obgleich sich auch dort bei der Vertiefung unseres Wissens Schwierigkeiten gezeigt haben. Dahingegen bedarf es grosser Sachkenntniss und grosser Vorsicht, wenn man sagen soll, ob ein im Wasser aufgefundener Kommabacillus als der Choleraerreger angesehen werden darf. Allen denjenigen, welche sich mit dieser Frage abgeben wollen, sei dringend angerathen, sich recht intensiv mit der Cultur der Choleravibrionen der verschiedensten Herkunft zu befassen, um auf diese Weise möglichst viele Variationen und Nüancen im Wachsthum der Choleramikroben kennen zu lernen, den Blick zu schärfen und das Urtheil zu reifen.

Das Hauptmerkmal ist zur Zeit noch das schon von Koch in seiner ersten Publikation, als besonders charakteristisch angegebene Wachsthum auf der Gelatineplatte und gerade diesem ist daher die vollste Aufmerksamkeit zuzuwenden.

Wenn man auch aus den Eigenthümlichkeiten des Wachsthums auf Gelatineplatten die Choleramikroben nicht von allen ähnlichen bekannten Vibrionenarten unter allen Umständen unterscheiden kann, so wachsen sie doch auf diesem Material meistens so eigenartig, dass in der Mehrzahl der Fälle die Diagnose darauf gestützt werden kann. Auch die Bemerkung Gruber's[1]), dass die ganz jungen Choleracolonien schon unregelmässige Gestalt, sowie körniges, zerklüftetes Gefüge oder Furchung zeigen, während

---

[1]) Archiv f. Hygiene 20, 123. Ueber die bakteriologische Diagnostik der Cholera und des Choleravibrio.

die übrigen Vibrionencolonien um diese Zeit noch runde, glatte, dunkle Kugeln darstellen, ist der vollen Beachtung werth.

Die Schwierigkeiten, welche der Diagnose auf Cholerabacillen aus Wasser sich entgegenstellen, sind dadurch entstanden, dass dort eine grössere Reihe von Vibrionen gefunden sind, die den Cholerabacillen ähnlich sehen.

Dunbar[1]), dem auf diesem Gebiete eine grosse Erfahrung zur Seite steht, unterscheidet zwischen solchen Vibrionen, die leicht, und solchen, die schwer von den Choleramikroben zu trennen sind. Zu den ersteren zählt er den von Finkler und Prior[2]) in faulendem Koth, von Gruber und seinen Schülern im Wasser des Donaucanals gefundenen — verflüssigt viel intensiver, giebt die Nitrosoindolreaction nicht —, den von Fokker[3]) aus Hafenwasser — Differenz in der Plattencultur —, den von Rénon[4]) aus Brunnenwasser — ist drei- bis viermal so lang und doppelt so breit als der Cholerabacillus —, den von Russel[5]) aus dem Golf von Neapel — wächst nicht bei Brüttemperatur —, den von Günther[6]) aus Spreewasser — giebt keine Nitrosoindolreaction —, den von Weibel[7]) aus Brunnenwasser — Differenz in der Plattencultur —, den von Kiessling[8]) aus Schlammwasser der Altonaer Sandwäsche — wahrscheinlich ebenso wie der Weibel'sche mit dem von Günther identisch —, den von Bujwid[9]) aus Wasser der Weichsel und aus einem Brunnen (Bac. choleroides α und β) — Differenz in der Plattencultur —, den von Löffler[10]) aus einem Stadtgraben in Demmin — stark verflüssigend wie Finkler und Prior —, den von Bonhoff[11]) aus Brunnenwasser von Stolp — keine Nitrosoindolreaction —, die von Blachstein und Sanarelli[12]) aus Seinewasser etc.

Zu den schwer zu unterscheidenden zählt Dunbar unter anderen den Vibrio Berolinensis; Günther[13]) indessen, ebenfalls

---

1) Versuche z. Nachweis v. Choleravibrionen im Flusswasser. Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt **9**, 379.

2) Tagebl. d. Versamml. deutsch. Naturforscher u. Aerzte in Magdeburg.

3) Deutsche med. Wochenschrift 1893, Nr. 7, S. 162.

4) Etudes sur quatre cas de Choléra; Ann. de l'Inst. Pasteur 1892, p. 630.

5) Zeitschr. f. Hygiene und Inf. **11**, 198.

6) Deutsche med. Wochenschrift 1892, Nr. 49, S. 1124.

7) Centralblatt f. Bakt. u. Par. **13**, 117.

8) Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt **8**, 430.

9) Centralblatt f. Bakt. u. Par. **13**, 120.

10) Centralblatt f. Bakt. u. Par. **13**, 384.

11) Archiv f. Hygiene 1893. **14**, 248.

12) Annales de l'Institut Pasteur 1893, p. 689 et 692.

13) Neisser und Günther, Archiv für Hygiene **19**, 194 u. 214.

ein sehr geübter Beobachter, der sich viel mit diesem Vibrio beschäftigt hat, will ihn sicher durch die Plattencultur differenziren können; die ein bis zwei Tage alten Colonien seien feinkörniger und hätten glatte und kreisrunde Ränder.

Der Vibrio danubicus ist ebenfalls dem Cholerabacillus sehr ähnlich, aber er verflüssigt durchschnittlich erheblich rascher und die Cultur ist für Tauben hochgradig pathogen, was nach den Untersuchungen Pfeiffer's der Cholerabacillus, trotz entgegenstehender Ansicht anderer Autoren, nicht ist.

Hierhin gehören ferner einige von Sanarelli aus Seinewasser gezüchtete Mikroben; leider sind die Angaben dieses Autors etwas summarisch. Ferner gehören hierher die von Spronck[1]) in fünf Wässern Hollands gemachten Befunde. Sind die von ihm gezüchteten Vibrionen nicht wirklich Choleramikroben, so stehen sie ihnen doch morphologisch sehr nahe.

In der letzten Zeit sind nun von Dunbar[2]) in dem neuen Hamburger Leitungswasser, im Elbwasser, dem Wasser der Unstrut, der Pregnitz, der Amstel, der Oder, des Rheines vielfach Bakterien gefunden worden, welche sich von den Cholerabakterien zunächst nicht unterscheiden liessen. Ein Theil derselben zeigte indessen im Dunkeln eine deutliche Phosphorescenz[3]). Diese Erscheinung ist bei wahren Cholerabacillen früher niemals beobachtet worden, doch ist sie vor Kurzem, sofern eine Verwechselung ausgeschlossen ist, von Rumpel[4]) in zwei Fällen bei anscheinend echten Cholerabacillen gesehen worden; andererseits verliert die Phosphorescenz dadurch etwas von ihrem Werth, dass sie bei den übrigen Vibrionen nicht constant vorkommt, bald vorhanden ist und nach einiger Zeit fehlt, oder umgekehrt, zuerst fehlt und sich später einstellt. Es ist also die Frage, ob die leuchtenden Vibrionen echte Cholerabacillen sind oder nicht, noch nicht ganz sicher entschieden, wenn auch die grösste Wahrscheinlichkeit für Verschiedenheit ist.

Dunbar selbst lässt die Frage offen, ob die von ihm gefundenen, nicht leuchtenden Wasservibrionen echte Cholerabacillen seien, denn wenn auch manche derselben zunächst in ihren culturellen Eigenschaften von den Cholerabacillen sich nicht unwesentlich unterschieden, so ist doch die Breite der Wachsthumserschei-

[1]) Referat im Centralblatt für Bakt. u. Par. 15, 53.

[2]) Versuche z. Nachweis v. Cholerabakterien im Flusswasser. Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt 9, 379.

[3]) Kutscher, Ein Beitrag zur Kenntniss der den Choleravibrionen ähnlichen Wasserbakterien. Deutsche med. Wochenschr. 1893, Nr. 49.

[4]) Berliner klinische Wochenschrift 1895, Nr. 4.

nungen der Choleraculturen verschiedener Herkunft einerseits gross und andererseits nehmen bei längerem Züchten die aus Wasser gewonnenen Vibrionen den Cholerabacillen gleiche oder sehr ähnliche Formen an.

In der letzten Zeit ist durch R. Pfeiffer[1]) eine Differenzirungsmethode gefunden, welche alle Beachtung verdient und hoffentlich von durchschlagendem Erfolg sein wird. Durch Injection von abgetödteten Choleravibrionen unter die Haut, später von virulenten Choleravibrionen in die Bauchhöhle kann man Meerschweinchen im Laufe mehrerer Monate gegen die 20- bis 30fache tödtliche Dosis virulenter Choleramikroben immunisiren. Tödtet man die Thiere durch Verbluten, so gewinnt man aus dem Blut ein Serum, welches im Stande ist, andere Meerschweinchen bei intraabdomineller Injection gegen sonst tödtliche Gaben von Cholerabacillen zu schützen. Mischt man nämlich 20 bis höchstens 50 mg des Serums mit 1 ccm Bouillon und 3 mg — der sicher tödtlichen Dosis einer vollvirulenten — Choleracultur und injicirt dieses Meerschweinchen in die Bauchhöhle, so bleiben die Thiere am Leben; schon innerhalb einer halben bis anderthalb Stunden werden, wie man an kleinen, mit Glascapillaren aus der Bauchhöhle der Thiere entnommenen Tröpfchen sehen kann, die Cholerabacillen zerstört, indem sie körnig zerfallen. Werden aber andere choleraähnliche Vibrionen, welche fast alle bei Injection in die Bauchhöhle dasselbe Krankheitsbild, wie die echten Choleramikroben erzeugen, mit der Bouillon und dem Immunserum injicirt, so werden diese Vibrionen nicht getödtet und das Thier stirbt unter den Seite 700 angegebenen Erscheinungen. Erweist sich diese Methode weiterhin als allgemein brauchbar, dann wird sie die Diagnose, ob Cholerabacillus, ob nicht, ganz wesentlich erleichtern; Vorbedingung ist nur, dass die gefundenen Vibrionen eine starke Virulenz besitzen und dass Immunserum zur Hand ist. Letzteres aber dürfte, vorläufig wenigstens, nur in grösseren Instituten bereitet und stets in geeigneter Qualität vorräthig gehalten werden können. Wir sind aus diesen Gründen auch in die Details der Frage nicht eingetreten, wollten aber andererseits nicht verfehlen, die Aufmerksamkeit der Leser auf diesen wichtigen Punkt zu lenken, da hier wahrscheinlich ein allgemeines Gesetz vorliegt, welches, mutatis mutandis, auch für die Diagnose des Typhus[2]) von durchschlagendem Erfolg sein kann.

---

[1]) Zeitschrift f. Hygiene u. Infect. 18, 1 und 19, 75; ferner Dunbar, Deutsche med. Wochenschr. 1895, Nr. 9.

[2]) R. Pfeiffer, Deutsche med. Wochenschr. 1894, Nr. 48.

Die Untersuchung eines Wassers auf Cholera wird sich ungefähr folgendermaassen gestalten:

Bei der Entnahme von Proben ist Rücksicht zu nehmen auf das starke Sauerstoffbedürfniss der Cholerabacillen und auf ihre Vorliebe für gute Nährstoffe, und damit auf die Nahrungscentren.

Man schöpfe daher nicht aus der Tiefe und nicht aus der Mitte der Wässer, sondern von der Oberfläche und vom Rande. Ist z. B. ein Steg in das Wasser hineingebaut, so werde an den Hölzern, welche den Steg tragen, geschöpft.

Bei Entnahme aus einem Brunnen sind drei Reihen von Proben erforderlich (man wird stets mehrere Kölbchen von jeder Probe ansetzen müssen); die erste Probe enthalte das Wasser, welches nach längerem Stehen zuerst aus der Pumpe entleert wird, die zweite das Wasser, welches nach dem vollständigen Leerpumpen des Pumpenrohres aus dem Brunnen direct kommt, die dritte werde aus dem zugänglich gemachten Brunnen an der Wasseroberfläche geschöpft, und zwar an verschiedenen Stellen des Brunnenmantels und des Pumpenrohres und, sofern schwimmende Partikel vorhanden sind, an oder mit diesen.

In dem Untersuchungsgange folgen wir den Ausführungen R. Koch's[1]), welche er in seiner classischen Abhandlung „Ueber den augenblicklichen Stand der bakteriologischen Choleradiagnose" niedergelegt hat, sofern nicht neuere Beobachtungen eine Abweichung erforderlich machen.

Von jeder Probe werden in mehrere Erlenmeyer'sche Kölbchen 100 g Wasser gegeben und 10 ccm einer 10 proc. Peptonkochsalzlösung hinzugesetzt.

In der Peptonkochsalzlösung vermehren sich die Choleramikroben und auch die meisten anderen Vibrionen sehr lebhaft, während die übrigen Bakterien in ihrer Entwickelung bedeutend zurückbleiben. Die Vibrionen trüben die Bouillon durch ihre Vermehrung und bilden an der Oberfläche ein mehr oder weniger starkes Häutchen. Diese Eigenthümlichkeit der Wasservibrionen und der Cholerabakterien, in Peptonkochsalzlösung besser zu wachsen als die meisten anderen Bakterien, ist von Dunbar benutzt zur Vorcultur, oder, wie Koch sagt, zur „Anreicherung" der Cholerabacillen, und wirklich gelingt es, auf diese Weise selbst wenige Cholerakeime zwischen vielen Tausenden anderer Mikroben im Wasser aufzufinden.

---

[1]) Zeitschr. f. Hygiene u. Infectionskrankheiten 14, 319.

Die übrigen älteren und neueren Anreicherungsmethoden und Vorculturen stehen, soweit die Wasseruntersuchung in Frage kommt, erheblich hinter der erwähnten zurück, welche jetzt allgemein und immer angewendet wird.

Die Kölbchen werden in den Brütapparat bei 37° C. gestellt. Nachdem sie dort 10, 15 und 20 Stunden gestanden haben, wird eine Platinöse an verschiedenen Stellen der Oberfläche eben eingetaucht. Die so entnommene Probe wird in Nährgelatine mit 1 Proc. Sodagehalt übertragen. Davon werden zwei Verdünnungen gemacht und Platten gegossen, die bei etwa 20 bis 22° C. aufgehoben werden.

Gefärbte Präparate geben Auskunft darüber, ob überhaupt Vibrionen in der Peptonlösung vorhanden sind.

Zugleich werden Agarplatten angefertigt, indem ebenfalls von der Oberfläche der Kölbchen Proben entnommen und mit Agar gemischt werden. Die in Petri'sche Schalen gegossenen Gemische werden (nach Schiller) behufs Erzielung einer trockenen Oberfläche offen in den Brütapparat gestellt. Koch mischt die entnommene Probe nicht mit dem Nähragar, sondern er hält Agarschalen vorräthig, die mehrere Tage gestanden haben, damit das Condensationswasser verdunste und eine feste Oberfläche entstehe, auf welche dann mit einer Platinöse die von der Oberfläche des Kölbchens genommenen Proben verstrichen werden.

Nach acht bis zehn Stunden findet die Untersuchung der Agarculturen statt. In Reincultur aufgefundene, gekrümmte Bacillen werden

1. in Röhrchen mit 10 ccm einproc. Peptonkochsalzwassers geimpft,
2. auf schräge Agarröhrchen gestrichen,
3. in Nährgelatine geimpft, die zu Platten ausgegossen werden,

und

4. in hängende Tropfen hohler Objectträger gebracht,
5. in feste Gelatine durch Stich übertragen,
6. sofern Material genügend vorhanden ist, gleich zu Thierversuchen verwendet.

Die Impfung von Blutserum und von Kartoffeln wird zur Stellung der Diagnose nur selten herangezogen.

Nach abermals acht Stunden wird darauf mit den Peptonröhrchen die Nitrosoindolreaction angestellt. (Man überzeugt sich durch eine gleichzeitig angesetzte Controlcultur mit Cholerabacillen in Peptonwasser von dem Gelingen der Reaction.)

Diejenigen Röhrchen, bei welchen die Reaction versagt, während die Controle die Nitrosoindolreaction giebt, werden sammt dem dazugehörigen Gelatine- und Agarröhrchen vorläufig ausgemerzt, sie enthalten keine Cholerabacillen. Die darin enthaltenen Vibrionen mögen später weiter bestimmt werden; die entsprechende Anleitung dazu, die Literaturhinweise finden sich auf den vorstehenden Seiten.

Es sei daran erinnert, dass der positive Ausfall der Nitrosoindolreaction auch bei anderen Vibrionen und nicht bei den Choleramikroben allein auftritt. Das Auftreten der Rosafarbe spricht desshalb nicht absolut für Cholera.

Unterdessen sind die erste und später die zweite Gruppe der Culturen auf den Gelatineplatten herangewachsen, die sehr sorgfältig geprüft werden müssen, weil, wie schon mehrfach erwähnt worden ist, die Cholerabacillen gerade dort sehr charakteristisch zu wachsen pflegen und das Wachsthum auf den Gelatineplatten zur Zeit noch den Ausschlag giebt in der Choleradiagnose.

Ergeben die Peptonröhrchen kein Choleraroth, so sind die aus den Kölbchen angefertigten Gelatineplatten besonders genau zu revidiren, und sind wiederum von den dort als „verdächtig" erscheinenden Colonien je ein Röhrchen mit schräg erstarrtem Agar und mit Peptonwasser zur Einleitung neuer Untersuchungen zu impfen.

Wenn die übrigen Charaktere nach Ausweis der Tabelle für Cholera sprechen, so kann man von der frischen Agarcultur Meerschweinchen impfen. Leider hat sich die Annahme, dass nur Cholera die Thiere unter den Seite 700 angegebenen Symptomen tödte, nicht bewahrheitet, es ist daher das Thierexperiment nicht streng beweisend. Sanarelli hat ausserdem gefunden, dass Cholerabacillen, welche vier Wochen im Wasser gelebt hatten, ihre Pathogenität verloren hatten. Die Identificirung durch Serum ist S. 712 besprochen.

Kuprianow fand, dass der Vibrio Koch, Vibrio Finkler-Prior, Vibrio Weibel, Vibrio Metchnikoff links drehende, der Vibrio Denecke (Käsespirillen), Vibrio Bonhoff *a* rechtsdrehende, und der Vibrio Berolinensis, sowie Vibrio Bonhoff *b* inactive Milchsäure erzeugen.

Aus Allem folgt, dass, wie beim Typhus, die in der Tabelle aufgeführten Eigenschaften sämmtlich (vielleicht mit Ausnahme der Impfung auf Blutserum und Kartoffel) zur Stellung der Diagnose auf Cholerabacillen herangezogen werden müssen.

c) Milzbrand.

Da die Milzbrandbacillen im Wasser nur kurze Zeit leben, die Sporen aber sich Monate lang halten und ihrer Schwere wegen bald zu Boden sinken, so ist es im Allgemeinen richtig, den Schlamm des verdächtigen Wassers zu untersuchen.

Diatroptoff[1]) führte die Untersuchung nach der Pasteur'schen Methode mit Erfolg aus. Er schwemmte 200 g Schlamm fünfmal hinter einander mit je 250 ccm sterilisirten Wassers auf und liess jedesmal in einem Spitzglas absitzen. Der Niederschlag aus der ersten Aufschwemmung wurde entfernt. Der Niederschlag der übrigen wurde 20 Minuten auf 90° C. erhitzt und dann zu Nährgelatine geschüttet, die zu Platten ausgegossen wurde. Es sei hinzugefügt, dass die Einimpfung des erhitzten Schlammbodensatzes in die Bauchhöhle von Kaninchen, Meerschweinchen und Mäusen ebenfalls rasch zum Ziele führt. Sterben die geimpften Thiere, so wird die Plattencultur aus Herzblut oder aus Milzpulpa anzeigen, ob der Milzbrandbacillus am Tode des Thieres betheiligt war oder nicht.

Soll das Wasser selbst untersucht werden, so geschieht das in der gewöhnlichen Weise durch Anfertigung von Gelatineplattenculturen; die verdächtigen Colonien werden nach Angabe der Tabelle weiter verimpft.

Sehr grosser Werth ist bei Untersuchung auf Milzbrand auf das Thierexperiment zu legen.

d) Eiterkokken.

Die Kokken der Eiterung im Wasser zu suchen, hat — besondere Verhältnisse ausgenommen — wenig Werth. Die Kokken sind fast ubiquitär, und wie sie beinahe in jede kleine Wunde eindringen, so werden sie auch in offene Wässer gelangen und dort, wenn nur das Augenmerk darauf gerichtet ist, vielfach gefunden werden. Glücklicherweise — so scheint es wenigstens — haben sie im Trinkwasser geringe Bedeutung.

Der Magen und Darm wird mit den Eindringlingen fertig, ohne dass Schädigungen durch sie entstehen. Würden die Eiterkokken im Darmcanal schädigen, so müsste diese Schädigung am deutlichsten bei den Säuglingen hervortreten. Bei ungefähr einem

[1]) Annales de l'Institut Pasteur 1893.

Drittel der stillenden Frauen finden sich — eingedrungen von den Oeffnungen auf der Warze her — in der Milch Eiterkokken, trotzdem sind gerade die Brustkinder die gesundesten und leiden am wenigsten an Brechdurchfall.

Man unterscheidet zwischen Traubenkokken (Staphylokokken) und Kettenkokken (Streptokokken) der Eiterung. Ihre Hauptmerkmale sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

	Staphylokokkus pyogenes	*Streptokokkus pyogenes*
Färbung:	Färben sich gut mit allen Anilinfarben, auch nach der Gram'schen Methode.	Gleichfalls.
Mikroskopisches Bild des gefärbten Präparates:	In Massen zusammenliegende, mittelgrosse, ziemlich isodiametrische Kokken gleichen Kornes.	Einzelne oder in Ketten zusammenliegende, nicht gleichmässig grosse Einzelwesen.
Gelatinestich:	Im Verlauf weniger Tage bildet sich eine trübe graue Verflüssigung längs des Stichcanals. Die Cultur sinkt bald zu Boden und nimmt dort ihre specifische Farbe an. Je nach der Farbe unterscheidet man den *staphylokokkus pyogenes, albus, aureus, citreus, flavus.*	Auf der Oberfläche kleine Hervorragungen, in der Tiefe des Stiches oft kleine Körnchen, wie aneinander gereihte, gelbweisse Perlchen. Sehr langsames Wachsthum.
Gelatineplatten:	Die stark gekörnte, dunkle, runde Colonie, die anfänglich scharf contourirt ist, verliert den scharfen Contour und sinkt die Gelatine verflüssigend in dieselbe ein.	Sehr kleine und sehr klein bleibende, stark lichtbrechende oder dunkle, nicht verflüssigende, scharf contourirte Colonien.
Schräg erstarrtes Nähragar mit Blutserum:	Lässt die aufgestrichene Cultur schon in 24 Stunden sich üppig entfalten, in 48 Stunden ist die specifische Farbe bereits stark ausgesprochen.	In 24 Stunden kleinste, Tröpfchen-ähnliche Culturen, die sich nicht wesentlich vergrössern.
Kartoffel:	Ueppiges Wachsthum mit specifischer Farbe unter Entwickelung eines Geruches nach saurem Kleister (Geruch wie bei *Mastitis suppurativa*).	Wächst entweder gar nicht oder in Gestalt sehr kleiner, weisser Knötchen.