

## V. Bakteriologische Untersuchung.

Wenn gleich im vorhergehenden Kapitel die niederen pflanzlichen Gebilde des Wassers behandelt worden sind, so erscheint es doch angezeigt, den einfachsten Formen derselben, den Bakterien, ein eigenes Kapitel zu widmen, zumal da dieselben in den letzten beiden Decennien ein besonderes Interesse für die Aufklärung der Aetiologie gewisser Krankheiten gewonnen haben. Weiterhin ist deren Erkennung und Bestimmung nicht durch das Mikroskop allein möglich, sondern es sind gewisse Maassnahmen nöthig, welche eine getrennte Behandlung erheischen. Nur durch die Züchtung, d. h. durch die Erzeugung von Massenverbänden derselben, lassen sich Merkmale einzelner Arten ausfindig machen, welche an der Hand des mikroskopischen Bildes eine Charakteristik des vorliegenden Gebildes ermöglichen.

Vorläufig ist man noch darauf angewiesen, die Verschiedenheit der Formen, die Eigenthümlichkeiten des Wachstums, die Veränderungen des Nährmediums u. dgl. zu registriren. Die Eintheilung der Bakterien in Familien ist bis jetzt zu einem Abschluss noch nicht gelangt. Die Meinungen hierüber sind noch getheilt. Für den Zweck dieses Buches mag es genügen, vorläufig nur auf die Formen hinzuweisen, wie sich dieselben im vergrösserten Bilde zeigen. Man findet kugelige Gebilde, die Mikrokokken, welche man je nach ihrer Zusammenlagerung als Staphylokokken bezeichnet, wenn dieselben als traubenförmige Häufchen erscheinen, oder als Streptokokken, wenn die Aneinanderreihung in Fadenform sich zeigt. Die letztere Art ist im Wasser die seltenere. Einen Uebergang zu den Bacillen, der Stäbchenform, müssen wir in den sogenannten ovalen Kokken ersehen.

Bei diesen ist der Querdurchmesser kürzer als der Längsdurchmesser, immerhin ist jedoch die cirkuläre Form in ihrer Randlinie vorherrschend, sie erscheinen als Ellipsen.

Einer andern Gestalt begegnen wir in der Stäbchenform, den eigentlichen Bacillen. Der Unterschied der Durchmesser hat diesen Gebilden den Namen gegeben. Nicht immer wird es möglich sein, eine bestimmte Angabe zu machen, ob solche Gebilde als ovale Kokken oder als Stäbchen zu betrachten sind, da auch letztere mitunter abgerundete Enden aufweisen. Hier können nur eingehende Beobachtungen bei der Züchtung entscheiden. Andererseits wird der Längendurchmesser, die kantige oder eckige Bildung der Enden die Diagnose erleichtern. Nicht immer sind die Längsseiten der Stäbchen von geraden Linien begrenzt, sie sind auch manchmal schwach bogenförmig gekrümmt. Diese Formen bilden den Uebergang zu den Vibrionen. Sie treten entweder als einzelne bogenförmige Gebilde auf, oder sie reihen sich mit ihren Enden aneinander, schraubenförmige Verbände bildend. Schliesslich ist noch diejenige Schraubenform zu erwähnen, welche eine Zusammensetzung aus einzelnen Theilen nicht erkennen lässt, sondern als ein ganzes Individuum erscheint, die Spirillen.

Der Körper der Bakterien besteht aus Protoplasma, das mit einer äusserst zarten Zellhaut überzogen ist. Nicht immer ist letztere ohne Vorbehandlung sichtbar, wenigstens lassen sich hierdurch Unterschiede in der Beschaffenheit des Plasmas feststellen. Die Fortpflanzung erfolgt entweder durch einfache Zelltheilung, oder durch Sporenbildung, d. h. Dauerformen, durch welche sie auch unter ungünstigeren Lebensbedingungen entwicklungsfähig erhalten werden können. Nicht bei allen Bakterien-Arten ist die Bildung von wirklichen Sporen beobachtet; wo dies der Fall ist, tritt im Innern des Zelleibes, entweder in der Mitte oder an einem der Enden, eine Aenderung seines Protoplasmas auf, welche sich durch die Bildung eines stark lichtbrechenden runden oder ovalen Körperchens kenntlich macht. Dieses unterscheidet sich durch Unterschiede in physikalischer oder chemischer Hinsicht von dem ursprünglichen Zellinhalte, indem es sich widerstandsfähiger gegen hohe Temperaturen erweist, oder sich bei den später zu erwähnenden Färbemethoden anders verhält.

### Die Herkunft der Bakterien.

Von den verschiedenen Wasserarten, welche zum menschlichen Genuss und Gebrauch verwendet werden, hat sich das als Quellwasser zu Tage tretende Grundwasser wohl von jeher eines besonderen Vorzuges erfreut und zwar in Folge seiner schon äusserlich auffallenden Reinheit. Und doch ist dieses Wasser nicht ganz von der Möglichkeit einer Verunreinigung durch Bakterien freizusprechen. Allerdings sind es nur Ausnahmen von der Regel, welche eine Besprechung des Grundwassers nach dieser Hinsicht erheischen; leider ist eine solche um so mehr geboten, als nach später darzulegenden Umständen vielenorts die Ausnahmen häufiger sind als die Regel. Vergegenwärtigen wir uns die Entstehung des Grundwassers, so ist für den grössten Antheil desselben, für den aus dem Niederschlagswasser entstandenen, Keimfreiheit im Voraus anzunehmen. Die filtrirende Eigenschaft des Bodens ist es, welche diese Behauptung rechtfertigt. Diese kommt nicht nur zur Geltung bei den feinsporigen Bodenarten, deren Kanäle ein kapillares Gepräge an sich tragen, sondern auch bei grossporigen, indem sich hier die Natur eines zweckentsprechenden Mittels bedient hat, das den gleichen Erfolg nach einer gewissen Zeit sichert. Die Fähigkeit der Bakterien, den Boden zu durchwandern, ist durch zahlreiche Untersuchungen geprüft worden, und es hat sich ergeben, dass dieselben nur wenige Meter in die Tiefe vordringen können. Eine solche Beobachtung kann nur auf eine äusserst wirksame Filtration zurückgeführt werden, die in dem Vorhandensein kapillarer Gänge im Boden, in deren Beschaffenheit und Krümmung ihre Erklärung findet. Insofern die Dichtigkeit dieses Filters durch physikalische Verhältnisse primär nicht bedingt ist, wird sie in kurzer Zeit geschaffen, indem das Niederschlagswasser eine Menge feinsten Stoffe von der Erdoberfläche abschwemmt, welche bei dessen Versickerung zur Verlegung grösserer Porenräume dienen. Auf diese Weise erwirbt sich auch ein grossporiger Boden nach und nach die Eigenschaften eines feinsporigen, indem er sich gewissermassen mit einer filtrirenden Schicht überzieht.

Es kommt noch ein Umstand hinzu, welcher die Entwicklungsfähigkeit der Bakterien mit zunehmender Tiefe ungünstig

gestaltet. Ungelöste, leblose organische Massen werden ebenfalls durch den Filtrationsvorgang frühzeitig abgeschieden und damit Nährmaterial den Bakterien entzogen, während andererseits die erhöhte Thätigkeit derselben die gelösten organischen Stoffe aufbraucht, ehe dieselben in eine gewisse Tiefe gelangen können. Wenn schon diese Verluste ungünstig auf die Entwicklung von Bakterien einwirken, so sind es umsomehr die relativ niederen Bodentemperaturen, die Abnahme von Sauerstoff und die Vermehrung der Kohlensäure gegenüber der äusseren Atmosphäre, welche eine gedeihliche Entfaltung ihrer Lebensthätigkeiten verhindern.

Die Ursachen, dass das Grundwasser trotzdem nicht immer frei von Bakterien befunden wird, liegen in einer anderen Richtung. Nicht immer ist die Länge des Weges, welchen dasselbe in die Tiefe zurücklegt, derart bemessen, dass eine vollständige Abscheidung der Bakterien stattfindet. Wenn beispielsweise die undurchlässige Bodenschicht sehr oberflächlich gelegen ist, so bewegt sich der Grundwasserstrom in der Zone der Bakterienthätigkeit und nimmt, namentlich bei stärkerem Gefälle, eine Anzahl der Keime mit sich fort, wie dies bei manchen Flachquellen der Fall ist. Seichte Brunnen sind in dieser Hinsicht immer als verdächtig zu betrachten, wenn dieselben bei nachgewiesener Bodenverunreinigung ein an Keimen reiches Wasser liefern.

Eine andere Art der Uebertragung von Bakterien ist dadurch gegeben, dass Undichtigkeiten des Bodenfilters durch äussere Ursachen eintreten; Erdarbeiten rücken oft sehr nahe an die Zone des Grundwassers heran oder legen diese sogar für längere Zeit bloss; hin und wieder stellen auch die Gänge verschiedener im Boden wohnender Thiere eine direkte Kommunikation zwischen Erdoberfläche und Grundwasser her. Das Niederschlagswasser wird unter solchen Verhältnissen denjenigen Weg einschlagen, welcher ihm den geringsten Widerstand bietet, und geht hierdurch jeglicher Filtration und Reinigung verlustig.

Wohl die häufigste Verunreinigung erfährt das Grundwasser an denjenigen Stellen, an welchen es angezapft wird, durch ungeeignete Anlage und Behandlung von Brunnen. Die schlechte Fassung einer Quelle kann das beste Wasser zu einem gesundheitsschädlichen und gefährlichen umgestalten, insofern sie den Zutritt von Unrath von aussen her ermöglicht. Es ist nahe-

liegend, dass man das Wasser an der am leichtesten zugänglichen Stelle zu fassen sucht, bei abfallendem Gelände wird dies immer der tiefste Punkt sein. Nicht selten findet man, namentlich auf dem Lande, dass Abwässer, ja sogar der flüssige Inhalt von Dunggruben, von höher gelegenen Punkten aus ihren Weg zur oder in die Nähe der Entnahmestelle des Trinkwassers nehmen. Aehnlich liegen oft die Verhältnisse bei dem sogenannten Schachtbrunnen. Um die Leistungsfähigkeit dieser Art von Brunnen thunlichst auszunützen, findet der Zutritt des Wassers nicht nur von der Sohle her statt, sondern es ist zu gleichem Zwecke die Mauerung der Wandung durchlässig gestaltet. Jede Verunreinigung des Bodens in der Umgebung des Brunnens führt möglicherweise zu bedenklichen Beimengungen von Bakterien zum Wasser. Ist schon an sich die Herstellung eines solchen Brunnens nicht zu empfehlen, so wird man bei der Wahl des Ortes ganz besonders darauf zu achten haben, dass dieser gegen äussere Verunreinigungen geschützt ist und bleibt. Selbstverständlich ist die Fernhaltung unsauberer Flüssigkeiten. Es ist aber auch Bedacht darauf zu nehmen, dass durch dichte Pflasterung in der Umgebung des Brunnens das Einsickern von Aufschlagwasser verhütet wird, dass diesem vielmehr Gelegenheit zu raschem Abfluss gegeben wird. Sobald das Wasser mit der Bodenoberfläche in Berührung gekommen ist, ist es mit Keimen inficirt, welche sich sehr rasch vermehren, so dass seine Beschaffenheit eine sehr ungünstige wird. Es ist häufig der Fall, dass derartig verändertes Wasser einen direkten Weg zu dem Brunneninhalt findet und diesen hierdurch verschlechtert oder unbrauchbar macht. Die leidige Gewohnheit der Wäschereinigung, bei der eine gewisse Wasservergeudung unvermeidlich ist, in der Nähe solcher Brunnen ist besonders zu tadeln, da neben der Unappetitlichkeit die Beimengung von Krankheitserregern zum Wasser nicht ausgeschlossen ist.

Wenn sonach das Vorhandensein von Spaltpilzen bei dieser Wasserart eine vermeidbare Ausnahme bildet, so muss deren Existenz in den zu Tage liegenden Gewässern geradezu als Regel betrachtet werden, so dass wir mit ihnen gewissermaassen als Wasserbewohner rechnen.

Die Lebensthätigkeit der Bakterien in der Erdkruste ist eine sehr vielseitige und demgemäss steigt ihre Vermehrung da-

selbst zu grosser Menge. Ein Theil derselben wird von dem Wind mit dem Staube fortgetragen und auf diesem Wege dem Oberflächenwasser zugeführt. Weit bedeutender ist die Anzahl derselben, welche durch die Bewegung des Wassers mit den Bodentheilchen losgerissen wird.

Ganz beträchtlich sind die Bakterienmassen, die mit fäulnisfähigen Substanzen in das Wasser gelangen, oder demselben durch Abwässer der verschiedensten Art zugeführt werden.

### Die Vermehrungsfähigkeit der Bakterien im Wasser.

Wenn sich aus dem Gesagten schon das Vorhandensein von Bakterien überhaupt im Wasser erklärt, so spricht für deren Anzahl die rasche Vermehrungsfähigkeit daselbst. Diese Eigenschaft war frühzeitig schon bekannt geworden, seitdem man sich mit den Lebensthätigkeiten dieser niederen Pflanzenformen beschäftigt hat; ein zahlenmässiger Beweis hierfür wurde durch das von Koch entdeckte Plattenverfahren erbracht. Durch viele Versuche ist erwiesen, dass Keime, auf eine günstige Nährflüssigkeit verimpft, in kurzer Zeit sich auf ein Vielfaches vermehren. Zunächst wird man geneigt sein, dies auf einen Ueberfluss von Nährmaterial zu beziehen, jedoch diese Beobachtung wurde auch gemacht bei der Verwendung von gewöhnlichem Wasser und sogar, wenn dieses destillirt worden war. Die letztgenannte Thatsache spricht für eine ungeheure Genügsamkeit des Bakterienlebens. Wollte man annehmen, dass die Existenz von Ernährungsmaterial allein maassgebend für die Vermehrungsfähigkeit der Bakterien sei, so müsste man logischer Weise schliessen, dass deren Anzahl in inficirten Gewässern mit der Zeit in's Unendliche wachsen müsste, da man doch voraussetzen darf, dass ausreichender Nährstoff hier stets geliefert wird. Dagegen hat das Experiment wie auch die Beobachtung in der Natur eine Abnahme der Keimzahl nach gewissen Zeiten gelehrt. Auf die Ursachen hiervon des Näheren einzugehen, ist hier nicht der Ort, es mag vielmehr die Andeutung genügen, dass im Laboratoriumsversuch Bedingungen vorliegen, welche ein Weiterleben erschweren, wie beispielsweise die Ausscheidung schädlicher Produkte durch die Keime selbst. Aber auch diese Erscheinung lässt sich wie andere für die Beobachtung in offen liegenden Gewässern nicht ver-

werthen, da sicher derartige Stoffe eine Verdünnung in kürzester Zeit erfahren, welche ihrer Unwirksamkeit gleichbedeutend ist. Wie bei allen Lebewesen, so ist es auch hier der Kampf um das Dasein, der eine Grenze zieht. Die im Wasser befindlichen niederen Pilze sind nicht alle gleicher Art und dementsprechend sind ihre Ansprüche verschieden; die schwächeren müssen den stärkeren unterliegen und unter wechselnden äusseren Bedingungen gewinnen die einen oder die anderen wieder die Oberhand, bis sich schliesslich gewissermaassen ein Gleichgewichtszustand einstellt, der Befund, den wir durchschnittlich durch unsere Untersuchungen konstatiren.

Ein gewisser Reichthum von Bakterien bildet demnach bei manchen Wasserarten die Regel, mit der wir rechnen müssen. Verschiedene Gründe waren es, die zu einer eingehenderen Beschäftigung mit denselben aufforderten. Die nächste Aufgabe lag in der Prüfung der einzelnen Arten auf die Möglichkeit, Krankheiten zu erzeugen. In dieser Hinsicht sind die meisten Wasserbakterien, soweit es bisher bekannt ist, unschuldiger Natur; es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass sich ihnen Krankheitserreger beimengen können. Ist schon deswegen eine bakteriologische Untersuchung des Wassers angezeigt, so ist sie es auch aus einem anderen Grunde, insofern als ein über das gewöhnliche Maass hinausgehender Bakterienreichthum Aufschluss über die Art und Grösse stattgehabter Verunreinigungen geben kann. Zufolge der Erkenntniss der einzelnen Arten und ihrer Lebensbedingungen ist ein Rückschluss auf ihre Herkunft ermöglicht, der manchmal trotz ihrer Unschädlichkeit den Genuss des Wassers verleidet, nach Umständen ekelerregend macht, selbst wenn die sichtbare Beschaffenheit des Wassers noch nicht darunter gelitten hat.

### Nachweis der Bakterien.

Wenn in einem Wasser Bakterien in sehr grosser Anzahl vorhanden sind, so wird es oft gelingen, sich von deren Anwesenheit zu überzeugen, indem man einen Tropfen Wasser unter dem Mikroskop bei starker Vergrösserung und enger Blende betrachtet. Ein solcher Befund ist jedoch für die Beurtheilung des Wassers in bakterieller Hinsicht nicht ausreichend. Abgesehen davon, dass diese einfachste Methode des Nachweises von Bakterien nie

zu einer zuverlässigen Unterscheidung der einzelnen Arten in dem Gemisch derselben führen kann, so wird auch die Schätzung der Anzahl mit unüberwindlichen Schwierigkeiten verbunden sein, welche durch die Kleinheit der Organismen, durch ihre eventuelle Beweglichkeit oder durch kapillare Strömungen unter dem Deckglas bei der relativ kleinen Oberfläche des zur Beobachtung gelangenden Gesichtsfeldes bedingt sind. Die Möglichkeit, sichere Anhaltspunkte in diesen beiden Richtungen, der Anzahl und Art der Bakterien, zu erlangen, verdanken wir insbesondere der genialen Entdeckung R. Koch's, der uns Methoden an die Hand gegeben hat, durch welche wir jeden einzelnen Keim zu einem Verbands gleichgearteter Organismen auswachsen lassen können. Durch diese Maassnahme vermögen wir die Anwesenheit des einzelnen Bakteriums als Kolonie zu erkennen, welche mit unbewaffnetem Auge bereits sichtbar ist, und weiterhin können wir durch die Anlage einer Reinkultur aus einer solchen Kolonie erst Eigenthümlichkeiten der betreffenden Bakterienart feststellen, welche zu einer Differenzirung derselben führen.

Das Princip dieser durch zahlreiche Erfolge in verschiedenster Hinsicht gekrönten Methode Koch's beruht in der Verwendung eines Nährmediums, welches bei gewissen Temperaturen entweder in flüssigem Zustande auftritt oder zu einer unbeweglichen Masse erstarrt. Koch erkannte in der Gelatine, welche er durch Zusatz von Nährstoffen und durch Veränderung ihrer chemischen Reaktion zu einem geeigneten „Nährboden“ für Bakterien umformte, das passende Mittel zur Erreichung dieses Zweckes. Indem eine solche Nährgelatine bei höheren Temperaturen, welche das Leben der Bakterien noch nicht beeinträchtigen, flüssig ist, gelingt es, Gemische derselben zu einer so gleichmässigen Vertheilung zu bringen, dass nach der Erstarrung jeder Keim einzeln fixirt ist und seine Existenz sich durch Auswachsen zu einer Kolonie verräth.

### Vorsichtsmaassregeln bei der Entnahme des Wassers.

Die grosse Vermehrungsfähigkeit der Bakterien sowie der Umstand, dass dieselben allenthalben verbreitet sind, erheischen gewisse Vorsichtsmaassregeln bei der Entnahme, deren Vernachlässigung nach Umständen zu einem trügerischen Ergebniss führt.

Es wird Fürsorge zu treffen sein, dass ein weiteres Hinzu-



treten von Bakterien oder eine Vermehrung derselben vor Einleitung der Untersuchung vermieden wird. Es muss deshalb schon bei der Entnahme des Wassers die unerlässliche Forderung aufgestellt werden, dass die Gefässe, welche zur Aufnahme desselben bestimmt sind, frei sind von Bakterien, oder dass die etwa vorhandenen durch ausgiebige Spülung mit dem zu prüfenden Wasser vollständig beseitigt werden. Auch hier, wie bei der für die chemische Untersuchung bestimmten Wasserprobe, wird man bestrebt sein, eine Durchschnittsprobe durch die Wahl des Entnahmeortes zu erzielen. Es ist daher gerathen, die Probe nie an der Oberfläche zu entnehmen und andererseits ein Aufrühren des Grundes stets zu vermeiden. Als geeignete Gefässe sind kleine Glaskolben von ungefähr 100 ccm Inhalt mit Watteverschluss, oder Flaschen von entsprechender Grösse mit Glasstöpselverschluss, welche in später zu erwähnender Weise vor dem Gebrauch sterilisirt sind, empfohlen worden. Insofern eine sofortige Untersuchung der Proben nicht angängig ist und durch die Versendung derselben in's Laboratorium längere Zeit verstreicht, hat man durch Eisverpackung die Vermehrung der Bakterien zu verhüten versucht. — Eine Vorrichtung, welche zum Zwecke der bequemeren Versendung erdacht wurde, möge hier Erwähnung finden. Man bläst an das eine Ende einer Glasröhre eine Kugel und zieht das anschliessende Rohr zu einer Kapillare aus. Nach gelindem Erwärmen der Kugel taucht man die Kapillare in destillirtes Wasser ein; in Folge des durch Abkühlung der ersteren entstehenden negativen Druckes füllt sich diese zum Theil. Durch vorsichtiges Erhitzen bringt man das Wasser zur Verdampfung und schmilzt zum Schluss das Ende der Kapillare in der Flamme zu. Hierdurch hat man einen sterilen und nahezu luftleeren Apparat erhalten. Schneidet man unter Wasser mit ausgeglühter Scheere die zugeschmolzene Stelle der Kapillare ab, so füllt sich die Kugel mit Wasser, wobei nach Abschmelzung der Oeffnungsstelle jede Verunreinigung mit anderen Bakterien ausgeschlossen ist. Der Apparat wird hiernach in geeigneter Weise in eine Blechbüchse mit Eis verpackt, um eine Vermehrung der Bakterien zu verhindern, und ist somit für den Versand fertig gestellt. Im Laboratorium wird die Kapillare an ihrer Ansatzstelle mittelst einer Glasfeile eingeritzt und vorsichtig abgebrochen. Durch die entstandene Oeffnung ent-

nimmt man mittelst sterilisirter Pipette (vgl. S. 128) die zur Untersuchung gewünschte Wassermenge. Die Methode leidet jedoch an einem Uebelstande; man hat eine so geringe Wassermasse entnommen, dass derselben das Prädikat einer Durchschnittsprobe nur in seltenen Fällen zukommt.

Vortheilhafter ist es, die geringe Quantität von Wasser, welche zur bakteriologischen Prüfung bestimmt ist, aus einer grösseren Wasserprobe zu entnehmen. Hierdurch kommt man der Wahrscheinlichkeit näher, eine Durchschnittsprobe zu erzielen. Es empfiehlt sich daher, einen Theil des für die chemische Untersuchung geschöpften Wassers für diesen Zweck zu benutzen. Allerdings wird man auf Schwierigkeiten stossen, grössere Probengefässe keimfrei zu machen. Um dies zu erreichen, kann man in die Flaschen einige Kubikcentimeter concentrirte Schwefelsäure geben, womit man die inneren Wandungen vollständig bespült. Die Säure wäre bei der Entnahme durch häufiges und sorgfältiges Spülen vollständig zu entfernen. Dieses Verfahren ist insofern misslich, als man nie eine absolute Gewissheit darüber hat, dass dies vollständig der Fall ist. Man darf jedoch auf Grund der Versuche von Heyroth annehmen, dass bei sorgfältiger, kurz vor der Entnahme vorgenommener Reinigung die Bakterien an der Glaswandung nicht so fest haften, dass sie durch energische Spülung, wenn diese sechsmal nach einander gründlich ausgeführt wird, nicht zu beseitigen wären.

Das Vermehrungsvermögen der Bakterien ist durch sehr enge Zeiträume begrenzt. Es ist daher erforderlich, die Einleitung der bakteriologischen Prüfung des Wassers, wenn möglich, sofort an Ort und Stelle nach der Entnahme oder doch nach thunlichst kurzer Frist zu bewerkstelligen. Nach Umständen wird das Verstreichen von wenigen Stunden das Ergebniss schon beeinflussen; diese Gefahr liegt namentlich vor, wenn die Wasserprobe eine ziemlich warme Temperatur besitzt oder einer solchen während des Transportes ausgesetzt wird. In solchen Fällen ist besondere Eile zu empfehlen.

Bevor wir in eine Schilderung der bakteriologischen Untersuchungsmethode des Wassers eintreten, müssen wir zunächst eine Beschreibung der Darstellungsweisen derjenigen Nährböden geben, vermittelst derer die Bakterien isolirt gezüchtet und in der Entwicklung ihrer Lebensäusserungen beobachtet werden können.

## Die Bereitung der Nährböden.

Es ist erklärlich, dass bei der Verschiedenheit der Bakterienarten die Ansprüche derselben hinsichtlich der Konsistenz und Zusammensetzung des Nährmaterials eine verschiedene sein muss. Im Allgemeinen entsprechen die nachstehend beschriebenen Nährböden den Anforderungen der meisten im Wasser vorkommenden Bakterien. Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass hier und da Veränderungen derselben nothwendig werden, deren Richtung sich aus dem eingehenden Studium der bestimmten, zu untersuchenden Art durch Beobachtungen während des Versuchs ergeben wird.

### 1. Die Nährgelatine.

Zur Darstellung der Nährgelatine nimmt man 500 g feingehacktes oder geschabtes, fettfreies Fleisch und übergießt dieses mit 1 l destillirten Wassers. Das sorgfältig umgerührte Gemisch lässt man an einem kühlen Orte, zur warmen Jahreszeit im Eisschranke, 12—24 Stunden stehen. Hierauf trennt man die Fleischstückchen von dem Wasser, indem man mittelst eines Trichters das Wasser durch ein reines Seihtuch ablaufen lässt und den Rest des letzteren durch Drücken mit der Hand oder durch eine Presse soweit entfernt, bis man ungefähr 1 l Flüssigkeit erzielt hat. Dieselbe enthält die in Lösung gegangenen Bestandtheile des Fleisches und stellt das „Fleischwasser“ dar. Zum gleichen Ziele gelangt man in kürzerer Zeit, wenn man das in derselben Weise angesetzte Hackfleisch ungefähr 2 Stunden im Kochen erhält. Hiernach lässt man das Ganze vollständig erkalten, damit das vorhandene Fett gerinnt. Durch Filtration wird dieses sowie das Fleisch beseitigt und die Flüssigkeit zu 1 l aufgefüllt.

Zu dem Fleischwasser werden 100 g käufliche weisse Speisegelatine der besten Sorte, 10 g Pepton (Peptonum siccum) und 0,5 g Kochsalz gegeben.

Um die Löslichkeit der Gelatine zu begünstigen, ist es nothwendig, diese zunächst aufweichen zu lassen. Das Gemisch wird daher so lange bei Zimmertemperatur belassen, bis diese gequollen ist. Hierauf erwärmt man vorsichtig im Wasserbade

bei einer Temperatur, dass eine Gerinnung der vorhandenen Eiweisskörper nicht erfolgen kann ( $50-60^{\circ}$ ), bis die zugeführten Substanzen vollständig gelöst sind.

Die Gelatine besitzt saure Reaktion, welche für das Wachstum der Bakterien nicht günstig ist. Um diese zu beseitigen, setzt man aus einem Tropfgläschen vorsichtig unter Umrühren eine gesättigte Lösung von Natriumkarbonat hinzu, bis die Flüssigkeit amphoter ist, d. h. blaues Lackmuspapier nicht mehr röthet und rothes nicht mehr bläut. Zur Ausscheidung der gelösten Eiweissstoffe wird der noch unfertigen Nährgelatine das Weisse eines Eies zugemischt und hierauf dieselbe im Wasser-

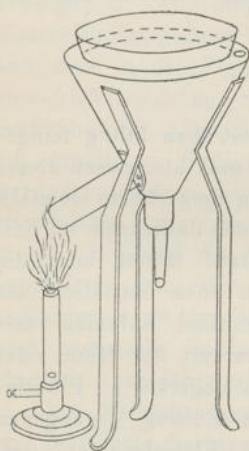


Fig. 63.

bade während 1—2 Stunden in Siedehitze erhalten. Man führt dieses zweckmässig in einem Glaskolben aus; das koagulierte Eiweiss schwimmt dann in Flocken in der Flüssigkeit und setzt sich zum Theil an der Glaswandung fest. Bei diesem Vorgange findet oft eine Nachsäuerung statt, man muss sich daher nochmals von der Reaktion der Gelatine überzeugen und diese jetzt durch Natriumkarbonat schwach alkalisch einstellen, so dass rothes Lackmuspapier eben leicht gebläut wird.

Um die Gelatine durchsichtig zu machen, wird sie durch eine doppelte Lage Filterpapier heiss filtrirt. Eine Gerinnung derselben hiebei wird verhütet, indem man den Trichter hin und wieder

vorsichtig mit der Flamme eines Bunsenbrenners erwärmt. Wenn die Filtration sehr langsam vor sich geht, reicht diese Maassnahme nicht aus, zudem zerspringt leicht der Glastrichter und macht alle vorher aufgewandte Mühe zu nichten. Es ist daher die Verwendung des Heisswassertrichters (Fig. 63) sehr zu empfehlen. Derselbe stellt einen doppelwandigen Blechtrichter dar, an welchen ein geschlossenes Rohr angesetzt ist. Der innere Raum wird durch eine am oberen Rande befindliche Oeffnung zum Theil mit Wasser gefüllt, das durch eine unter das Rohr gestellte Flamme im Sieden erhalten wird. Die Höhlung dieser Heizvorrichtung nimmt den Glastrichter auf.

Wenn die Gelatine ganz klar filtriert und Proben derselben sich bei dem wiederholten Aufkochen nicht mehr trüben, so kann sie nunmehr in Reagenzröhrchen eingefüllt werden.

Es ist erwünscht, in denselben stets annähernd gleiche Mengen von 8—10 ccm zu haben. Um dieses bequem zu bewerkstelligen, hat Treskow einen sinnreichen Apparat (Fig. 64) konstruiert. Durch entsprechende Stellung des Hahnes, welcher dreiwegig gebohrt ist, füllt man zuerst den graduirten Mess-

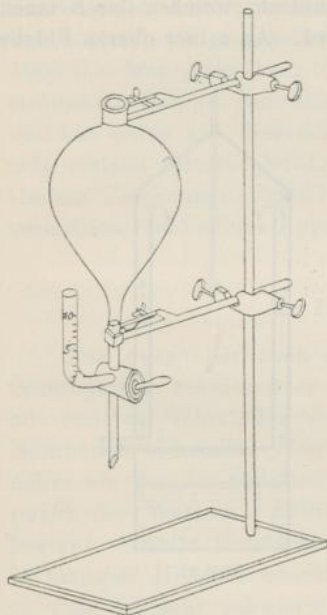


Fig. 64.

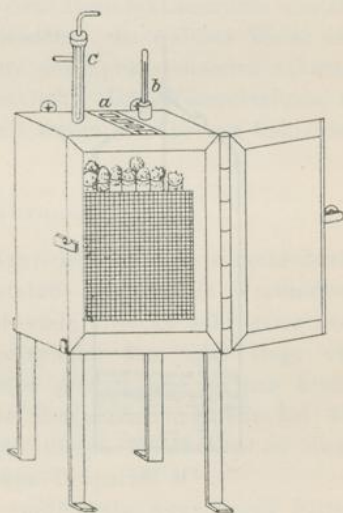


Fig. 65.

cylinder und lässt dann seinen Inhalt in das Reagenzröhrchen ablaufen. Hierbei ist eine Benetzung der inneren Wandung desselben vorsichtig zu vermeiden, da sonst der später aufzusetzende Watteverschluss anklebt und dann dessen Entfernung bei der Handhabung des fertigen „Gelatineröhrchens“ Schwierigkeiten bereitet.

Eine Verunreinigung der an sich durch das Kochen keimfrei gewordenen Gelatine ist durch thunlichste Fernhaltung von Bakterien zu vermeiden. Man wird daher auf möglichste Rein-

heit des Umfüllungsapparates achten und weiterhin für eine geeignete Zurichtung der Reagenzröhrchen sorgen. Diese werden mit Bürste und Wasser gründlich gereinigt, mit destillirtem Wasser nachgespült, getrocknet und hierauf mit einem Watterpfropf verschlossen. In einem Becherglas oder Drahtkorb setzt man sie in einen Heissluftschrank (Fig. 65) und erhitzt sie daselbst ungefähr 1 Stunde auf  $150^{\circ}$  C., um sie zu sterilisiren. Die Watte bräunt sich hierbei leicht. Der Heissluftschrank ist ein doppelwandiger Kasten aus Eisenblech, welcher durch einen untergestellten Gasbrenner erhitzt wird. An seiner oberen Fläche

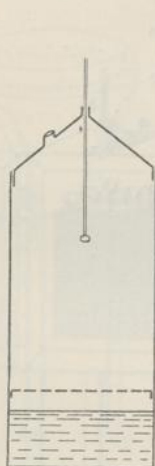


Fig. 66.

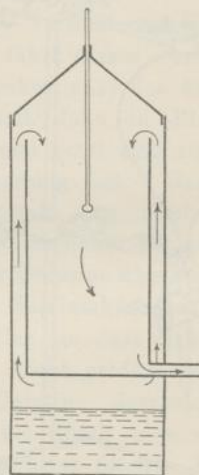


Fig. 67.

trägt er bei a einen Ventilationschieber. Zur Kontrolle der Temperatur ist bei b ein Thermometer eingelassen, welches in das Innere des Apparates hineinragt; die Regulirung der Wärme besorgt ein Thermoregulator c, dessen Beschreibung an anderer Stelle (S. 148) erfolgt.

Die umgefüllte Gelatine ist schliesslich noch endgültig zu sterilisiren, um die inzwischen hinzutretenen Keime zu vernichten. Zu diesem Zwecke werden die gefüllten Reagenzröhrchen im strömenden Dampf auf 1 Stunde erhitzt. Dies geschieht in dem Dampftopf. Die Einrichtung der einfachsten Form zeigt die Fig. 66. Der Wasserspiegel ist durch einen Rost von dem

Desinfektionsraum getrennt, auf welchen die zu sterilisirenden Gegenstände gewöhnlich in einem Blecheinsatz gestellt werden. Ein in das Innere ragendes Thermometer zeigt die dort befindliche Temperatur an. Die Erhitzung und Verdampfung des Wassers geschieht durch eine Gasflamme. Als Nachtheil des Apparates ist angeführt worden, dass nach Umständen die Luft durch die am Deckel befindliche Oeffnung nicht vollständig entweicht, da sie specifisch schwerer ist als der Wasserdampf. Ein Gemisch von letzterem und Luft besitzt nicht in dem Maasse keimtödtende Eigenschaften wie der reine Wasserdampf von  $100^{\circ}$  C. Man hat daher die Anordnung so getroffen, dass der strömende Dampf von oben in den Desinfektionsraum eintritt und von unten aus demselben entweicht. In welcher Weise dies sehr einfach erreicht wird, ist aus der nebenstehenden schematischen Zeichnung (Fig. 67) ersichtlich. Um Wärmeverluste zu vermeiden, sind solche Apparate mit einem Filzüberzug bekleidet.

## 2. Das Nähragar.

Das Agar oder auch Agar-Agar ist ein von verschiedenen Seetangarten herrührender Gallertstoff, welcher in Verbindung mit anderen Nährstoffen einen für viele Zwecke sehr geeigneten Nährboden darstellt. Der Schmelzpunkt des Agar liegt viel höher als der der Gelatine; derselbe grenzt nahe an den Siedepunkt des Wassers, während die Gerinnung ungefähr bei  $40^{\circ}$  beginnt. Dieser Unterschied macht diesen Nährboden zu einem in mancher Hinsicht unentbehrlichen Präparat.

Es ist sehr schwierig, das verflüssigte Agar durch Filtration klar zu bekommen. Man wird daher bestrebt sein, bei der Herstellung dieses Nährbodens von den zuzusetzenden Bestandtheilen ungelöste Stoffe vor der Beigabe des Agar zu beseitigen. Die Grundlage bildet auch hier wie bei der Nährgelatine das Fleischwasser. Dasselbe wird in einer der oben beschriebenen Arten unter Hinzufügung der gleichen Mengen von Pepton ( $10\%$ ) und Kochsalz ( $0,5\%$ ) bereitet. Um alle fällbaren Eiweisskörper zu beseitigen, wird das sauer reagirende Gemisch von Fleischwasser, Pepton und Kochsalz, ohne es vorher zu neutralisiren, im Dampftopf 1 Stunde lang erhitzt und die Filtration desselben durch Filterpapier erst nach dem Erkalten vorgenommen. Zu je 1 Liter dieser

Flüssigkeit werden 10 oder höchstens 20 g Agar gegeben. Das Agar wird in Form von Pulver, Streifen oder vierkantigen Stangen in den Handel gebracht; in den letzten beiden Fällen wird man es vorher mittelst einer Scheere zerkleinern. Die Verflüssigung desselben im Fleisch-Pepton-Wasser geschieht auf dem freien Feuer oder zweckmässiger im Dampftopf, um eine Einengung der Flüssigkeit zu vermeiden.

Nunmehr wird die saure Reaktion durch Zusatz von gesättigter Natriumkarbonatlösung in der bereits erläuterten Weise in eine eben alkalische umgewandelt. Um sämtliche Stoffe auszufällen, welche zu späteren Trübungen Veranlassung geben können, wird das Ganze während 2 Stunden im Dampftopf erhitzt.

In Folge der dichteren Konsistenz und der leichteren Gerinnungsfähigkeit des Agar ist die Filtration des Nährbodens schwierig und zeitraubend; dieselbe muss durch ein doppeltes Faltenfilter erfolgen, und man wird hierbei den Heisswassertrichter nicht vermissen können.

In bequemerer Weise kann man die Klärung erzielen, wenn man die Abkühlung der heissen Masse so langsam erfolgen lässt, dass die schwimmenden Theilchen genügende Zeit haben, sich vollkommen zu Boden zu setzen. Zu diesem Behufe nimmt man die Verflüssigung des Agar im Fleisch-Pepton-Wasser sowie die Alkalisirung in einem grossen Becherglase vor und lässt den Inhalt desselben nach Vollendung der vorgeschriebenen Erhitzung im Dampftopf ganz allmählich erkalten. Der gewonnene Agarcylinder wird durch Einsenkung des Glases in siedendes Wasser an seiner Oberfläche zum Schmelzen gebracht, um aus dem Gefässe entfernt werden zu können. Mittelst eines Messers schneidet man diejenige Agarmasse ab, in welcher sich die unlöslichen Bestandtheile angesammelt haben; der übrige Theil ist zur Umfüllung in Reagenzröhrchen nach nochmaliger Verflüssigung fertig. Dieselbe erfolgt in der gleichen Weise wie bei der Gelatine; nach nochmaliger einstündiger Sterilisation im Dampftopf lässt man den Nährboden erkalten und erstarren und damit sind die „Agarröhrchen“ zum Gebrauche geeignet.

Manche Bakterienarten gedeihen besser auf dem Nähragar, wenn demselben Glycerin zugesetzt wird. Dasselbe wird dann vor der Verflüssigung des Agar dem filtrirten Fleischwasser zugefügt, gewöhnlich in einer Menge von 6 Procent.



### 3. Die Nährbouillon.

Das Fleischwasser selbst findet ohne Zusatz von Gelatine oder Agar Verwendung als flüssiger Nährboden. Seine Herstellungsweise ist die gleiche, wie solche bei der Bereitung der beiden vorstehend geschilderten Nährböden erörtert worden ist. Man zieht 500 g feingehacktes oder geschabtes, fettfreies Fleisch entweder auf kaltem Wege oder durch zweistündiges Erhitzen mit 1 l destillirten Wassers aus, füllt in letzterem Falle wieder zum ursprünglichen Volumen auf, fügt 10 g Pepton und 5 g Kochsalz hinzu und macht das Ganze durch Natriumkarbonat sehr schwach alkalisch. Hierauf trennt man nach dem Erkalten die Fleischtheilchen und das Fett mittelst eines Seihtuches ab und erhitzt die Flüssigkeit ungefähr eine Stunde im Dampftopf zur Ausfällung etwa noch vorhandener, fällbarer Eiweissstoffe und macht die Flüssigkeit schwach alkalisch. Nach der Filtration durch ein doppeltes Faltenfilter wird die klare Bouillon in Reagenzröhrchen umgefüllt und in diesen nochmals sterilisirt.

### 4. Das Blutserum.

Der seröse Bestandtheil des Blutes bildet für die Bakterienforschung einen wichtigen Nährboden. Um denselben in steriler Form zu gewinnen, sind folgende Maassregeln geboten. Hohe, nicht zu enge Glascylinder werden durch einen Wattepfropf verschlossen und in dem oben erwähnten Heissluftschrank (S. 120) sterilisirt. Bei der Schlachtung von Thieren lässt man zunächst den ersten Blutstrom abfliessen und fängt den nachfolgenden im Glascylinder nach vorsichtiger Entfernung des Wattepfropfens auf, wobei eine Berührung des unteren Endes des letzteren sorgfältig zu vermeiden ist. Den mit Blut gefüllten Cylinder lässt man im Eisschrank oder an einem anderen kühlen Ort ruhig stehen, bis vollständige Gerinnung erfolgt ist. Das über dem Blutkuchen stehende klare Serum wird mit einer Pipette von 10 ccm Inhalt, welche in gleicher Weise wie der Cylinder keimfrei gemacht ist, abgehoben und in sterile, mit Wattepfropf verschlossene Reagenzröhrchen umgefüllt.

Wenn dieses Serum längere Zeit bei einer Temperatur von 65—68° C. gehalten wird, so erstarrt es zu einer durchsichtigen

Masse. Die Zeit, in welcher dies erfolgt, ist verschieden je nach der Abstammung des Blutes; am schnellsten gerinnt Hammelserum, am langsamsten das von Kälbern. Es ist darauf zu achten, dass die Gerinnung nahe den erwähnten Temperaturgrenzen eintritt; erfolgt sie über  $70^{\circ}$ , so entsteht eine milchig-trübe, undurchsichtige Masse, welche zu Kulturzwecken weniger geeignet ist. Um den Vorgang bequem ausführen und überwachen zu können, wird der durch nebenstehende Figur 68 dargestellte Apparat verwendet. Die doppelten Wandungen des Blechkastens schliessen zwischen sich Wasser ein, durch dessen Temperatur der Innenraum des Apparats bis zur gewünschten Wärme gebracht

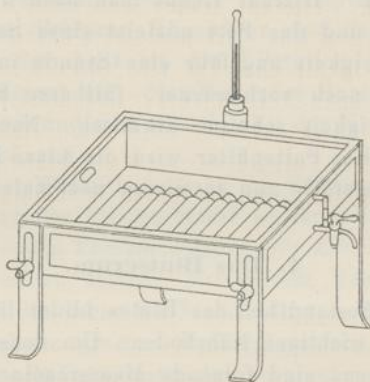


Fig. 68.

und erhalten wird. Der Fläche, auf welcher die Reagenzröhrchen zu liegen kommen, ist eine gewisse Neigung gegeben, damit das Blutserum schräg erstarrt, da es in dieser Form zur Kultur eine grössere Fläche bietet.

Wenn mit der nöthigen Sorgfalt bei der Entnahme des Blutes und der Umfüllung des Serums verfahren worden ist, so wird der grössere Theil der Reagenzröhrchen keimfrei sein. Dies ist der Fall, wenn bei mehrtägigem Verweilen derselben in Bruttemperatur (vergl. S. 148) keine Trübung eintritt. Man geht jedoch sicherer, wenn man das Serum sterilisirt, indem man es mehrere Tage hinter einander während 1–2 Stunden auf  $56^{\circ}$  erhitzt und dann wieder in die Brutwärme zurückbringt. Hierdurch werden die Bakterien zerstört. Der Grund, warum dies bei der

relativ niederen Temperatur gelingt, liegt darin, dass etwa hingerathene Sporen zur vegetativen Form auskeimen, in welcher sie schon bei einer Wärme von  $56^{\circ}$  in ihrer Lebensfähigkeit geschädigt werden.

Man kann diese „diskontinuierliche Sterilisation“ schon vor Herbeiführung der Gerinnung vornehmen und wird dies immer thun, wenn das Serum als flüssiger Nährboden Verwendung finden soll.

Eine weitere Methode, das Serum keimfrei zu machen, besteht darin, dass man es im Röhrchen mit etwas Chloroform versetzt und mit demselben durch Schütteln vermischt. Nach Verdampfung des letzteren ist der Nährboden gebrauchsfähig. Nach Bedarf wird er in der geschilderten Weise zur Gerinnung gebracht. Bei dem Zusatz und der Verflüchtigung des Chloroforms ist der Zutritt von Tageslicht zu vermeiden, da unter dessen Einfluss sich das Chloroform bei Gegenwart von Wasser in Salzsäure und Phosgen ( $\text{COCl}_2$ ) zersetzt. Beide Stoffe sind dem Bakterienwachsthum feindlich.

### 5. Die Kartoffel als Nährboden.

In gekochtem Zustande ist die Kartoffel für viele Bakterienarten ein geeignetes Nährmedium. Um sie für diesen Zweck brauchbar zu machen, sind verschiedene Wege eingeschlagen worden. Nach Koch's Vorschlag wurde zuerst die ganze Kartoffel sammt Rinde benutzt. Letzterer haften noch Reste von Erde an, in welcher sich sehr widerstandsfähige Sporen befinden. Zur Beseitigung und Unschädlichmachung derselben ist vor der eigentlichen Sterilisation durch Kochen eine Vorbehandlung der Kartoffel nothwendig, welche zum Theil eine Beseitigung oder Vernichtung der an der Oberfläche haftenden Keime in sich schliesst. Aus der Rinde derselben werden zunächst die schadhafte Stellen und die Keimansätze („Augen“) mittelst eines spitzen Messers trichterförmig ausgeschnitten. Hierauf wird die Kartoffel unter fließendem Wasser mit einer starren Bürste kräftig gebürstet, um die anhaftenden Bodentheilchen zu beseitigen. Nachdem die Kartoffel ungefähr 1 Stunde in  $1\frac{0}{100}$  Sublimatlösung (1 g Sublimat in 1 Liter destillirten Wassers gelöst, welchem 5 ccm Salzsäure zugesetzt sind) gelegen hat, wird sie im Einsatz

des Dampftopfes dem strömenden Dampfe von 100° eine Stunde lang ausgesetzt. Nach erfolgter Abkühlung nimmt man sie heraus, schneidet sie mit einem ausgeglühten, wieder erkalteten Messer in der Mitte durch und bringt sie in die später geschilderte (S. 130) „feuchte Kammer“, die Schnittflächen nach oben kehrend. Bei dieser Procedur darf die Kartoffel nur mit Fingern angefasst werden, welche vorher in Sublimatlösung obiger Zusammensetzung getaucht worden sind. Selbstverständlich ist bei der bakterienfeindlichen Eigenschaft des Sublimats eine Benetzung der für die Kultur bestimmten Fläche vollständig zu vermeiden.

Eine sehr bequeme Methode zur Herstellung dieses Nährbodens ist von von Esmarch angegeben worden. Man schneidet aus einer rohen Kartoffel Scheiben und legt diese nach Entfernung der Schale in Glasdosen. Das Ganze wird im Dampftopfe 1 Stunde lang sterilisirt. Eine vorausgegangene Sterilisirung der Glasdose im Heissluftschrank wird den Erfolg der Keimfreiheit mehr sichern, jedoch ist dieselbe entbehrlich, da von der Einwirkung des strömenden Dampfes eine vollständige Abtödtung der Keime zu erwarten ist.

Sehr zweckmässig ist die Anlage von Kartoffelkulturen im Reagenzglase, da hierbei von aussen zutretende Verunreinigungen am wirksamsten ferngehalten werden. Diese Methode wurde von Bolton, Globig und Roux eingeführt. Man sticht mit einem Korkbohrer aus einer Kartoffel einen Cylinder aus, schneidet an beiden Enden die Schale ab und theilt ihn durch einen schräg durchgelegten Schnitt in zwei Hälften, um je eine grössere, gerade Fläche zu erzielen. Je eine Hälfte schiebt man in ein Reagenzröhrchen, schliesst mit einem Wattepfropf und sterilisirt das Ganze 1 Stunde lang im strömenden Dampf. Auch hier ist empfohlen worden, das Glasgefäss vorher durch heisse Luft keimfrei zu machen. Bei dieser Zubereitung der Kartoffel sammelt sich immer am Boden des Reagenzglases Kondensationswasser an, welches bei der Benutzung des Nährbodens lästig ist. Um diesen Uebelstand zu beseitigen, liess Roux Röhrchen fertigen, welche 1 cm oberhalb des Bodens ringförmig eingengt sind; Hüppe schützte die Kartoffel vor Benetzung, indem er sie auf Watte bettete, und Günther hielt das Kondens-Wasser durch untergelegte, kurze Glasröhrchen fern.

Die chemische Reaktion der Kartoffel ist nicht immer gleich, meistens ist dieselbe sehr schwach sauer. Für manche Zwecke ist es erwünscht, auch diesen Nährboden schwach alkalisch zu machen. Um dies zu erreichen, legt man die Kartoffel-Cylinder oder -Scheiben ungefähr eine halbe Stunde in sehr verdünnte Natriumkarbonatlösung.

## Die Ausführung der bakteriologischen Untersuchung des Wassers.

Mit Hilfe der vorher geschilderten Nährböden wird es leicht sein, den Nachweis zu führen, ob im Wasser Bakterien vorhanden sind oder nicht, wenn es sich nur um diesen handelt. Vermischt man das Wasser mit denselben oder lässt es eine gewisse Zeit mit ihrer Oberfläche in Berührung, so wird bei sonst günstigen äusseren Bedingungen (Temperatur) das Wachstum der Bakterien Veränderungen der sichtbaren Beschaffenheit des Nährbodens hervorrufen, welche für ihre Anwesenheit zeugen. Diese allgemeine Beobachtung wird jedoch in den seltensten Fällen für die Beurtheilung eines Wassers in bakteriologischer Hinsicht ausreichen; es ist vielmehr nothwendig, die einzelnen Keime zu isoliren.

### 1. Die Isolirung der Keime.

Wie schon oben erwähnt, ist es nicht möglich, einen einzelnen Keim isolirt der Beobachtung und Untersuchung in hinreichendem Maasse zugänglich zu machen; man wird vielmehr nur das gewünschte Ziel erreichen, wenn man denselben durch seine Vermehrungsfähigkeit zu einem Verbande gleichgearteter Individuen, zu einer Kolonie, auswachsen lassen kann. Durch die früher geübten Verdünnungsmethoden in flüssigen Nährmedien war man allerdings auch in der Lage, verschiedene Arten aus einem Gemisch von Bakterien einzeln darzustellen und sie waren die erste Veranlassung zu einer Klassificirung; die vollständige Ausnutzung eines vorliegenden Bakterienmaterials in dieser Beziehung verdanken wir jedoch allein der Entdeckung Koch's, welche in der Verwendung erstarrender und durchsichtiger Nährmedien gipfelt.

## Die Gelatine- oder Agar-Platte.

Vermischt man eine bestimmte Menge Wassers mit verflüssigter Gelatine und giesst letztere auf einer Glasplatte aus, so werden die einzelnen Keime auf eine grössere Oberfläche vertheilt und wachsen daselbst zu Kolonien aus. Jede Kolonie entspricht sonach ursprünglich einer Bakterie. Diese Voraussetzung ist nur bei Erfüllung gewisser Maassregeln zutreffend.

Zunächst muss die Wasserprobe vor der Bearbeitung kräftig durchgeschüttelt werden. Die Bakterien haften meistens in grösserer Anzahl an den suspendirten, organischen Bestandtheilen, nach Umständen sind sie, namentlich in ruhenden Gewässern, zu aneinanderhängenden Verbänden vereinigt. Eine Trennung und möglichst gleichmässige Vertheilung im Wasser wird durch eine solche energische Bewegung angestrebt, und auch in zureichender Weise meistens erzielt.

Gleichzeitig wird die Gelatine verflüssigt, indem man die Röhrchen genügend lange in Wasser von  $37^{\circ}$  eintaucht, wobei eine Benetzung des Wattepfropfens zu vermeiden sein wird. Hierauf wird eine bestimmte Menge des zu untersuchenden Wassers zugesetzt, dessen Volumen mit einer in Zehntelgrade getheilten Pipette von 1 ccm Inhalt abgemessen wird. Die Pipetten sind vor jeder Untersuchungsreihe 1 Stunde lang im Heissluftschrank zu sterilisiren, in welchem sie in eine Eisenblechschachtel oder in einen mit Wattepfropf verschlossenen Glaszylinder gestellt werden. Unter solchem Verschluss halten sich dieselben ziemlich lange steril; bei ihrer Handhabung ist blos darauf zu achten, dass sie nur an ihrem oberen Ende mit den Fingern berührt werden. Es wird die Frage auftauchen, wieviel Wasser man zur Untersuchung verwenden soll. Im Allgemeinen wird man nie über 1 Kubikcentimeter hinausgehen, da grössere Mengen die Gerinnungsfähigkeit der Gelatine beeinträchtigen. Um annähernde Anhaltspunkte über die Anhäufung der Bakterien zu erhalten, kann man einen Tropfen Wasser auf ein Deckglas bei sehr gelinder Wärme verdampfen, letzteres nach später zu beschreibenden Methoden (S. 143 u. ff.) färben und aus dem Bilde unter dem Mikroskop sich von der mehr oder minder dichten Lage der Bakterien überzeugen. Diese Schätzung schliesst die Subjektivität des Einzelnen in sich; der sicherste Weg ergibt

sich aus der Uebung. Die Erfahrung hat gelehrt, dass bei reinen Quell- und Brunnenwässern und bei gereinigten (filtrirten) Oberflächenwässern das Maass von 1 Kubikcentimeter nicht zu gross ist, dass man jedoch bei zu Tage liegendem Wasser auf 0,5, 0,2 oder 0,1 Kubikcentimeter heruntergehen muss. Lässt die sichtbare Beschaffenheit oder die Berücksichtigung der örtlichen Verhältnisse eine besonders starke Verunreinigung des Wassers vermuthen, so muss man zu Verdünnungen schreiten. Diese sind immer mit destillirtem Wasser anzufertigen, welches eine halbe Stunde lang im Dampftopf oder durch entsprechend langes Kochen sterilisirt worden ist. Man giebt beispielsweise in ein Reagenzröhrchen mit einer Pipette 10 ccm dieses sterilen, destillirten Wassers, entfernt hievon 1 ccm und fügt 1 ccm des zu prüfenden

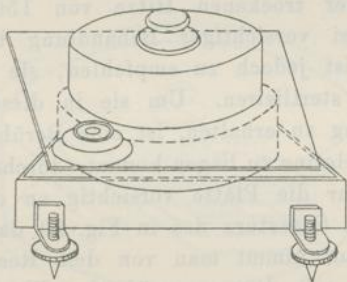


Fig. 69.

Wassers hinzu. Verwendet man zur Verimpfung 0,1 ccm der Mischung, so entspricht dies sonach 0,01 ccm des zu untersuchenden Wassers. Selbstverständlich muss das Reagenzröhrchen und die zu verwendenden Pipetten vor dem Gebrauch steril gemacht worden sein.

Um eine gleichmässige Vertheilung der Bakterien in der Gelatine zu erzielen, muss diese gehörig mit dem zugefügten Wasser gemischt werden. Dies geschieht durch längeres, vorsichtiges Schwenken des Reagenzröhrchens, wobei eine Blasenbildung und die Benetzung des Wattepfropfens sorgfältig zu vermeiden ist.

Bei dem Ausgiessen der Gelatine sind zwei Bedingungen erforderlich, nämlich, dass sie nicht von der Glasplatte abläuft und dass sie auf derselben rasch erstarrt; beide werden durch den vorstehenden Apparat (Fig. 69) erfüllt. Auf einem Dreieck

steht eine Schale, welche mit einer Glasplatte überdeckt ist. Wenn man die Schale mit Eiswasser gefüllt hat, um eine Abkühlung der Glasplatte zu erzielen, so bringt man letztere mittelst der Stellschrauben unter Benutzung einer Dosenlibelle in vollkommen wagrechte Lage. Nun ist der Apparat zum Gebrauch fertig; ein darauf gestellter Glassturz dient dazu, die später hier liegende Gelatine vor dem Hineinfallen von Keimen aus der Luft zu schützen.

Die verflüssigte Gelatine wird auf Platten gegossen, welche aus weissem Fensterglas geschnitten sind; eine handliche Grösse derselben ist ungefähr 10 : 14 cm. Diese müssen natürlich vor ihrer Verwendung steril gemacht werden. Zu diesem Behufe giebt man sie in eine Eisenblechdose und setzt sie in dieser 1 Stunde lang der trockenen Hitze von 150° im Heissluftschrank aus. Bei vorsichtiger Behandlung bleiben dieselben lange steril; es ist jedoch zu empfehlen, sie vor jeder Untersuchungsreihe zu sterilisiren. Um sie in diesem Zustande bis zu ihrer Benutzung zu erhalten, ist eine Berührung der Fläche, auf welche die Gelatine zu liegen kommt, durchaus zu vermeiden. Man fasst vielmehr die Platte vorsichtig an den Rändern und legt sie unter den Glassturz des in Fig. 69 dargestellten Giess-Apparates. Hierauf nimmt man von dem Reagenzröhrchen, in welchem sich die mit dem zu prüfenden Wasser geimpfte und verflüssigte Gelatine befindet, den Wattepfropf ab und erhitzt die Oeffnung an der Flamme. Indem man das Röhrchen in schräger Lage in der Hand behält, um das Hineinfallen von Keimen aus der Luft zu verhüten, wartet man die Abkühlung des vorher erhitzten Theiles ab und giesst hiernach die Gelatine auf der Glasplatte aus. Für die spätere Zählung der sich entwickelnden Keime ist es angezeigt, der Gelatinefläche eine bestimmte Form zu geben; dies kann man erreichen, indem man dieselbe mit dem offenen (noch sterilen) Ende des Röhrchens entsprechend den Rändern der Glasplatte zu einem Rechteck formt.

Sobald die Gelatine erstarrt ist, bringt man die Platte, sie ebenfalls wieder vorsichtig nur an den Rändern berührend, in die „feuchte Kammer“. Unter der feuchten Kammer versteht man einen Raum, in welchem für zureichende Feuchtigkeit der Luft zur Verhütung des Eintrocknens der Platten gesorgt ist. Man erreicht dies, wenn man den Boden einer grossen Glas-



schale, von ungefähr 20 cm Durchmesser, mit einem befeuchteten Filtrirpapier belegt und dies mit einer Glocke überdeckt. Unter derselben (Fig. 70) befinden sich übereinander gestellte Glasbänkchen, auf welche die „Gelatineplatten“ zu liegen kommen. Um ein Abgleiten der letzteren zu verhüten, wird jedes Bänkchen mit einem Streifen Filtrirpapier belegt, welcher jedoch die Ränder desselben nicht überragen darf. Dieser dient zugleich zur Aufzeichnung und Kennzeichnung der betreffenden Platte. Eine Sterilisirung der verwendeten Gegenstände ist bei der Herstellung der feuchten Kammer nicht erforderlich, da diese mit der Gelatine nicht in Berührung kommen. Das früher empfohlene Ausspülen der Glasschale und -glocke mit Sublimatlösung kann man bei sorgfältiger Reinlichkeit entbehren. Es ist sogar wahr-

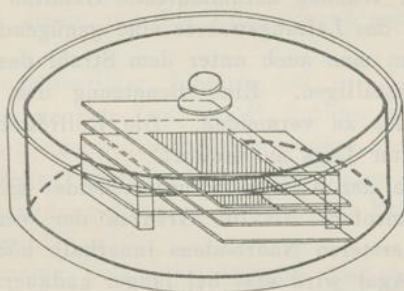


Fig. 70.

scheinlich, dass das verdampfende Sublimat die Entwicklung oberflächlich liegender Keime hemmt. Das Auffallen von Tropfen des Kondenswassers auf die oberste Platte wird verhütet, indem man diese mit einem Glasbänkchen und einer darauf gelegten grösseren sterilen Glasplatte überdeckt.

Eine bequemere Methode der Anlage von Kulturplatten ist durch die Anwendung der Petri'schen Schalen ermöglicht. Dieselben stellen niedrige Glasdosen von 9 cm Durchmesser dar; sie werden vor dem Gebrauche im Heissluftschrank steril gemacht. Wenn dieselben nicht geöffnet an geeignetem Platze aufbewahrt werden, so erhalten sie längere Zeit ihre Keimfreiheit. Bei dem Giessen der Gelatine hebt man sorgfältig den Deckel senkrecht, jedoch nicht zu hoch, auf und lässt die Gelatine unter den gleichen Vorsichtsmaassregeln wie oben in den unteren Theil

der Dose einfließen. Hat man die Gelatine durch leichte Bewegung der Petri'schen Schale gleichmässig auf ihre Unterlage vertheilt, so lässt man sie in wagrechter Lage erstarren.

Von v. Esmarch ging der Vorschlag aus, die geimpfte Gelatine im Reagenzröhrchen selbst in dünner Schicht auszubreiten. Diese Methode der „Rollröhrchen“ ist für manche Fälle sehr zweckmässig, namentlich, wenn es sich um den Nachweis einer geringeren Anzahl von Keimen handelt. Die Herstellung eines Rollröhrchens ist folgende. Die verflüssigte Gelatine wird in gleicher Weise wie vorher mit dem zu untersuchenden Wasser gemischt. Hierauf wird über den Wattepfropf des Röhrchens eine kleine, gut anliegende Gummikappe gezogen und dieses in nahezu wagrechter Lage im Eiswasser um seine Axe gedreht, bis die an den Wänden herumlaufende Gelatine vollständig erstarrt ist. Hat das Leitungswasser eine genügend niedrige Temperatur, so kann man auch unter dem Strahl desselben die Gerinnung bewerkstelligen. Eine Benetzung des Wattepfropfens durch letztere ist zu vermeiden. Die Rollröhrchen werden in nahezu wagrechter Lage aufbewahrt.

Die Anlage der Agarplatte unterscheidet sich von der der Gelatineplatte insofern, als die Grenzen der Verflüssigung und Gerinnung des ersteren Nährbodens innerhalb höherer Temperaturen liegen. Agar wird erst bei länger andauernder Siedehitze flüssig und gerinnt ungefähr bei  $40^{\circ}$ , wie bereits erwähnt worden ist. Demgemäss ist das Hinzufügen der zu prüfenden Wasserprobe erst dann zu bewerkstelligen, wenn eine schädigende Einwirkung der höheren Temperatur auf die Keime ausgeschlossen ist. Die Agarröhrchen werden in einem Wasserbade von  $100^{\circ}$  so lange gehalten, bis ihr Inhalt vollständig flüssig geworden ist. Man überlässt hierauf das Ganze sich selbst, bis die Abkühlung so weit gediehen ist, dass ein eingesetztes Thermometer die Temperatur des Wassers auf  $40^{\circ}$  anzeigt. Hiernach nimmt man erst die Verimpfung vor und verfährt im Uebrigen, wie eben geschildert worden ist. Da man sich sehr nahe an der Gerinnungsgrenze des Agar befindet, so sind die nachfolgenden Maassnahmen des Giessens sehr rasch auszuführen.

Die Agarplatten gewähren den Vortheil, dass sie bei einer höheren Temperatur (Brutschrank) gehalten werden können, wodurch eine schnellere Auskeimung und Bildung von sichtbaren

Kolonien erreicht und demgemäss die Erzielung des Untersuchungsergebnisses in kürzerer Zeit herbeigeführt wird. Sie sind ferner namentlich in denjenigen Fällen zu empfehlen, wo das Vorhandensein vieler die Gelatine verflüssigender Bakterienarten (vergl. S. 137) störend bei der Anwendung der vorher geschilderten Methode auftritt. Hierzu wird auch die Nährgelatine geeignet, wenn man sie mit 1% Agar versetzt.

Hat man durch eine der beschriebenen drei Arten den Nährboden auf eine grössere Oberfläche zur Gerinnung gebracht, so lässt man die darin einzeln vertheilten Keime zur Auskeimung kommen, indem man die Gelatineplatten oder Rollröhrchen bei Zimmertemperatur nicht unter  $15^{\circ}$  und nicht über  $22^{\circ}$ , die Agarplatten durchschnittlich bei  $37^{\circ}$  hält. In der heissen Jahreszeit sind erstere nach Umständen in einem kühlen Raum, in dem Keller oder in einem mit Eis entsprechend gekühlten Schrank unterzubringen.

Als ein nachtheiliger Einfluss auf die Entwicklung der Bakterien ist in neuerer Zeit von H. Buchner und Anderen die Einwirkung des Sonnenlichtes erkannt worden; aus diesem Grunde wird man den Zutritt direkten Lichtes bei diesen Kulturversuchen sowohl, wie auch den später zu erwähnenden Reinkulturen thunlichst vermeiden.

Als allgemeine Vorsichtsmaassregel mag noch Erwähnung finden, dass der Ort, an dem man die Kulturplatten herstellt und mit denselben hantirt, möglichst staubfrei ist. Unnöthiges Umhergehen sowie alles, was ein Aufwirbeln von Staub bewirkt, ist zu vermeiden, damit der ausgebreitete Nährboden nicht durch hereinfliegende Keime aus der Luft verunreinigt wird.

## 2. Die Bestimmung der Anzahl der Keime.

Unter den günstigen Wachstumsbedingungen, welche durch den Nährboden und durch die geschaffenen äusseren Verhältnisse (Feuchtigkeit, Temperatur) gegeben sind, vermehrt sich jeder einzelne Keim zu zahllosen, gleichgearteten Individuen, welche in Folge ihrer Massenhaftigkeit nach gewissen Zeiten mit unbewaffnetem Auge, oder doch schon bei mässigen Vergrösserungen als „Kolonie“ erkennbar sind. Von der fast durchwegs sicheren Annahme ausgehend, dass jede einzelne der Kolonien ihre Ent-

stehung nur einem Keime verdankt, ist eine Zählung derselben der Bestimmung der Anzahl der ursprünglich vorhanden gewesenen Keime gleichbedeutend.

Nur in denjenigen Fällen, in welchen das Wasser einen geringen Bakteriengehalt aufweist, wird es möglich sein, die Zahl der Kolonien absolut genau zu bestimmen; meistens wird man sich mit einer abgerundeten Schätzung begnügen müssen. Allerdings werden bei Verwendung der zum Zählen konstruirten Apparate Resultate erzielt, welche der Wirklichkeit sehr nahe kommen und für die hygienische Beurtheilung ausreichen. Ein

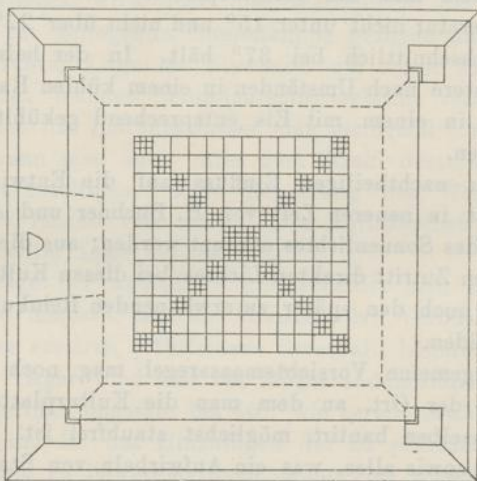


Fig. 71.

solcher wurde zuerst von Wolffhügel konstruirt, der zweckentsprechend ist. Auf geeignetem Holzgestelle (Fig. 71) ruht eine Glasplatte, auf welcher Felder von 1 □ cm Fläche eingeritzt sind; manche derselben weisen durch Parallel-Linien noch eine weitere Theilung in  $\frac{1}{9}$  □ Centimeter auf, um die Zählung dicht gedrängt stehender Kolonien zu erleichtern. Durch eine Schwärzung des Holzgestelles unter dieser Glasplatte heben sich die Kolonien deutlich ab und sind mittelst einer Lupe gut erkennbar. Die Handhabung des Apparates besteht darin, dass man die Kulturplatte auf die eben beschriebene Glasplatte legt und mittelst der Lupe mehrere Quadrate (nicht unter zehn) auszählt. Man

wird hierbei auf die mehr oder minder dicht bewachsenen Stellen Rücksicht nehmen und demgemäss die Felder, auf welche viele oder wenige Kolonien treffen, in nahezu gleicher Anzahl auswählen. Jedes gezählte Feld wird mit einer Marke bedeckt, um Wiederholungen zu vermeiden. Aus den erhaltenen Zahlen berechnet man, wie viele Kolonien durchschnittlich auf 1  $\square$  cm treffen; das Ergebniss multiplicirt man mit der Anzahl der Quadratcentimeter der Gelatinefläche und erhält hierdurch annähernd die Anzahl der in der verwendeten Wassermenge ursprünglich vorhandenen Bakterien.

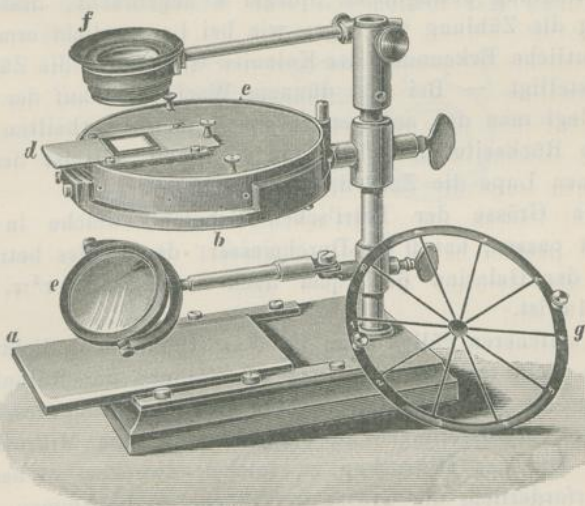


Fig. 72.

Bei diesem Verfahren ist eine gewisse Subjektivität nicht ausgeschlossen, da die Auswahl der Quadrate in dem Belieben des Untersuchers steht. Diesem Einwand suchte Heyroth zu begegnen durch die Konstruktion eines anderen Zählapparates, der allerdings nur für Kulturplatten in Petri'schen Schalen Verwendung finden kann. Die Bauart des Apparates (Fig. 72) ist folgende: In den Fuss des Statives ist eine schwarz gebeizte Holzplatte a eingelassen, welche als Hintergrund dient; an demselben ist der Zählring b festgeschraubt. Die Rundung desselben beherbergt einen Ring, in welchen die Petri'sche Schale so ein-

gelegt wird, dass die untere Fläche der Gelatineplatte nach oben gerichtet ist. Dieser Ring hat aussen eine Eintheilung in 10 gleich weit entfernte Punkte, in welche eine Feder einschnappt; durch seine Drehung kann man somit 10 verschiedenen Stellen der Platte zur Besichtigung bringen. Der Zähl Tisch ist mit einer Platte bedeckt, welche einen stellbaren Schieber  $d$  mit einem Fensterchen trägt, in welches Rähmchen von 1,0 bis 0,1  $\square$  cm Lichtweite eingelegt werden. Je nach Stellung des ersteren kann man die Quadrate in einem grösseren oder kleineren Kreise zählen. Zur günstigen Beleuchtung der Kolonien ist ein nach jeder Richtung beweglicher Spiegel  $e$  angebracht, dessen Benutzung die Zählung bei Tages- wie bei Lampenlicht ermöglicht. Die deutliche Erkennung der Kolonien wird durch die Zähl Lupe bewerkstelligt. — Bei sehr dünnem Wachsthum auf der Kulturplatte legt man den anliegenden, in Segmente getheilten Kreis  $g$  auf die Rückseite derselben und bestimmt mittelst der abgenommenen Lupe die Zahl der Kolonien.

Die Grösse der Petri'schen Schalen, welche in diesen Apparat passen, hat 9 cm Durchmesser; demgemäss beträgt die Fläche der Gelatine 63,5 qcm nach der Formel  $r^2\pi$ , wobei  $\pi = 3,14$  ist.

In selteneren Fällen kann das Wachsthum ein so dichtes sein, dass es nicht mehr möglich ist, die Zählung der Kolonien mit der Lupe zu bewerkstelligen. Man ist daher angewiesen, sich stärkerer Vergrösserungen zu bedienen und zum Mikroskop zu greifen. Um das Mikroskop zu solchen Zwecken zu benutzen, ist es erforderlich, die Grösse der Fläche zu bestimmen, welche bei einem bestimmten Okular und Objektiv sichtbar wird, indem man den Durchmesser des sichtbaren Kreises mit einem Mikromillimeter-Maasstab misst und dessen Fläche unter Berücksichtigung der jeweiligen Vergrösserung nach  $r^2\pi$  berechnet. Solche Bestimmungen können nur dann Anspruch auf Zuverlässigkeit haben, wenn die Vertheilung der Kolonien auf der Platte eine sehr gleichmässige ist, und die Menge derselben in recht zahlreichen Gesichtsfeldern ermittelt worden ist.

Zur Zählung der in einem Rollröhrchen sich entwickelnden Kolonien ist von v. Esmarch ein zweckmässiger Apparat (Fig. 73) konstruirt worden. Derselbe besteht in einer Klammer, die zur Aufnahme des Röhrchens dient. Ein daran befindlicher Schieber

ermöglicht die Einstellung eines Quadratcentimeters, oder des Theiles eines solchen, auf der Gelatinefläche. Eine verstellbare Lupe und eine schwarze Glasplatte als Unterlage dienen zur deutlichen Erkennung der einzelnen Kolonien.

Die Frage, wann solche Kulturversuche auf der Platte, in der Petri'schen Schale oder im Rollröhrchen zum Zählen reif sind, lässt sich zeitlich genau nicht abgrenzen, da die Entwicklung der einzelnen Bakterien zu sichtbaren Kolonien von vielen äusseren Umständen, insbesondere von der obwaltenden Temperatur abhängig ist, und anderseits das Wachsthum der verschiedenen Arten ein schnelleres oder langsames sein kann. Im

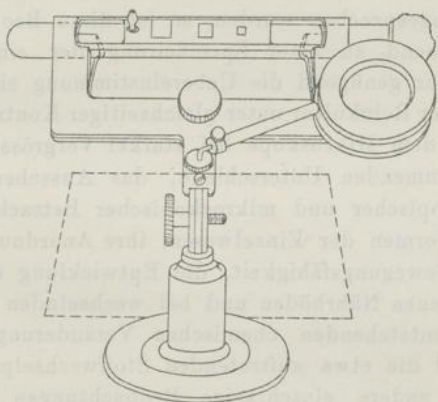


Fig. 73.

Allgemeinen kann man sagen, dass dann der richtige Zeitpunkt für diesen Theil der bakteriologischen Wasseruntersuchung gegeben ist, wenn alle Kolonien unter der angewandten Vergrößerung deutlich als solche erkennbar sind. Manche Keime besitzen die Eigenschaft, die Gelatine chemisch zu verändern, indem sie, peptonisierend wirkend, dieselbe verflüssigen. Hierdurch entsteht die Gefahr, dass solche Kolonien in einander überfließen, wobei sie als einzelne nicht mehr bestimmbar sind. Wenn auch die Erhaltung der Kreissegmente die Bestimmung im vorgeschrittenen Stadium noch ermöglicht, so mahnt doch das Ineinanderfließen zum Abschluss der Untersuchung, da hierbei festwachsende Keime betroffen werden können, deren Entwicklung

eine langsamere ist. Die beigegefügte Tafel zeigt eine solche Platte, welche zum Zählen geeignet ist. Dieselbe ist hergestellt, indem man eine geöffnete Petri'sche Schale auf Kopirpapier aufgelegt und hierauf die direkten Sonnenstrahlen hat einwirken lassen. Es ist nur hierbei darauf zu achten, dass letztere senkrecht auffallen.

Die Zahl der Keime wird auf 1 ccm Wasser berechnet und in dieser Weise zum Ausdruck gebracht.

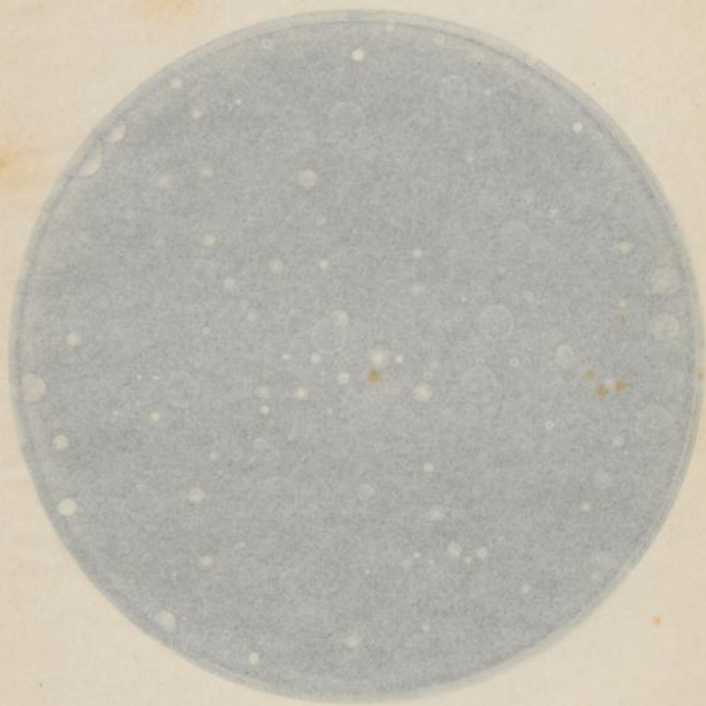
### 3. Die Bestimmung der Arten der Keime.

Wenn auch bereits verschiedene Formen der Bakterien namhaft gemacht worden sind, welche für eine Eintheilung derselben in Klassen angesprochen wurden, so ist diese Beobachtung doch nicht ausreichend zu einer Specificirung der einzelnen Arten. Hierfür ist nur genügend die Uebereinstimmung einer Reihe von Merkmalen der Reinkultur unter gleichzeitiger Kontrolle der Einzelwesen unter dem Mikroskope bei starker Vergrößerung. Die in Betracht kommenden Unterschiede, das Aussehen der Kolonie bei makroskopischer und mikroskopischer Betrachtung, die verschiedenen Formen der Einzelwesen, ihre Anordnung im Wachstum, ihre Bewegungsfähigkeit, die Entwicklung der Reinkultur auf verschiedenen Nährböden und bei wechselnden Temperaturen, die hierbei entstehenden chemischen Veränderungen des Nährmediums und die etwa auftretenden Stoffwechselprodukte, diese sowie noch andere einschlägige Beobachtungen sind für die Diagnostik der Bakterienarten tabellarisch verzeichnet, oder, in soweit es sich um bildliche Darstellungen handelt, auf photographischem Wege naturgetreu dargestellt worden.

Es würde den Rahmen des vorliegenden Werkes über Gebühr erweitern, wollte man auf eine gesonderte Darstellung solcher Befunde bei den im Wasser vorkommenden Bakterien des Näheren eingehen; es muss vielmehr auf die bakteriologische Diagnostik, Hilfstabellen zum praktischen Arbeiten von James Eisenberg, auf die Diagnostik der Bakterien des Wassers von A. Lustig (ins Deutsche übersetzt von R. Teuscher) und auf den mikrophotographischen Atlas der Bakterienkunde von C. Fraenkel und R. Pfeiffer verwiesen werden. Im Nachfolgenden sind nur die Erscheinungen geschildert, welchen bei den beschriebenen Züchtungsmethoden eine besondere Aufmerksamkeit zuzuwenden ist. Bei dem stetig



Okmüller.



*Kulturplatte aus 0,1 cem eines bakterienreichen Wassers hergestellt.*

eine langsamere ist. Die beigelegte Tafel zeigt eine solche Platte, welche zum Zählen geeignet ist. Dieselbe ist hergestellt, indem man eine geöffnete Petri'sche Schale auf Kopirpapier aufgelegt und hierauf die direkten Sonnenstrahlen hat einwirken lassen. Es ist nur hierbei darauf zu achten, dass letztere senkrecht auffallen.

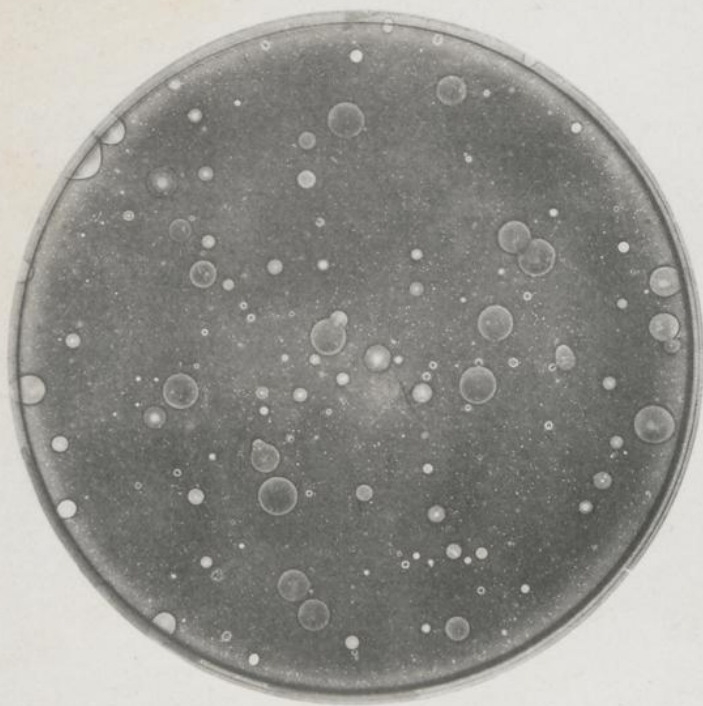
Die Zahl der Keime wird auf 1 ccm Wasser berechnet und in dieser Weise zum Ausdruck gebracht.

### 3. Die Bestimmung der Arten der Keime.

Wenn auch bereits verschiedene Formen der Bakterien namhaft gemacht worden sind, welche für eine Eintheilung derselben in Klassen angesprochen wurden, so ist diese Beobachtung doch nicht ausreichend zu einer Specificirung der einzelnen Arten. Hierfür ist nur genügend die Uebereinstimmung einer Reihe von Merkmalen der Reinkultur unter gleichzeitiger Kontrolle der Einzelwesen unter dem Mikroskope bei starker Vergrößerung. Die in Betracht kommenden Unterschiede, das Aussehen der Kolonie bei makroskopischer und mikroskopischer Betrachtung, die verschiedenen Formen der Einzelwesen, ihre Anordnung im Wachstum, ihre Bewegungsfähigkeit, die Entwicklung der Reinkultur auf verschiedenen Nährböden und bei wechselnden Temperaturen, die hierbei entstehenden chemischen Veränderungen des Nährmediums und die etwa auftretenden Stoffwechselprodukte, diese sowie noch andere einschlägige Beobachtungen sind für die Diagnostik der Bakterienarten tabellarisch verzeichnet, oder, in soweit es sich um bildliche Darstellungen handelt, auf photographischem Wege naturgetreu dargestellt worden.

Es würde den Rahmen des vorliegenden Werkes über Gebühr erweitern, wollte man auf eine gesonderte Darstellung solcher Befunde bei den im Wasser vorkommenden Bakterien des Näheren eingehen; es muss vielmehr auf die bakteriologische Diagnostik, Hilfstabellen zum praktischen Arbeiten von James Eisenberg, auf die Diagnostik der Bakterien des Wassers von A. Lustig (ins Deutsche übersetzt von R. Teuscher) und auf den mikrophotographischen Atlas der Bakterienkunde von C. Fraenkel und R. Pfeiffer verwiesen werden. Im Nachfolgenden sind nur die Erscheinungen geschildert, welchen bei den beschriebenen Züchtungsmethoden eine besondere Aufmerksamkeit zuzuwenden ist. Bei dem stetig

Ohlmüller.



*Kulturplatte aus 0,1 ccm eines bakterienreichen Wassers hergestellt.*

fortsch  
lichkei  
den di

S  
sich U  
eine D  
gleiche  
deren  
wir „f  
scheine  
Gelatin  
minder  
eine c  
andere  
erkenn

Z  
terien;  
ist als  
aufzufa  
mannig  
zu we  
auffall

N  
bei d  
Vergrö  
tungs  
begeg  
Rände  
sicht e  
durch  
förmig  
Grenz  
sie sch  
messer  
äusser

fortschreitenden Studium der Bakteriendiagnostik muss die Möglichkeit, solche weiter auszubauen, betont werden, immerhin werden dieselben zur Richtschnur hierfür dienen.

a) Das makroskopische Aussehen der Kolonien.

Schon während des Wachstums der Kulturplatte machen sich Unterschiede an den Kolonien bemerkbar, welche sich für eine Differenzierung verwerthen lassen. Wir beobachten die ungleiche Entwickelungsenergie in der Grösse der letzteren und in deren Form. Wie bereits angedeutet worden ist, unterscheiden wir „festwachsende“ und „verflüssigende Bakterien“; erstere erscheinen als körperhafte, kugelige oder ovale Gebilde in der Gelatine, während letztere als flache, eingesenkte, mehr oder minder kreisrunde Scheiben auftreten, welche nach Umständen eine centrale Aufhäufung der Bakterien oder eine radiäre oder andere Anordnung derselben in Form von Punkten oder Streifen erkennen lassen.

Zu verwerthen ist auch die Farbstoffbildung gewisser Bakterien; diese liegt nie innerhalb des Bakterienkörpers, sondern ist als ein gewissermaassen intercellulares Ausscheidungsprodukt aufzufassen. Die Wahrnehmungen in dieser Hinsicht sind die mannigfaltigsten und bewegen sich in zahlreichen Farbentönen, zu welchen sich hin und wieder Brechungserscheinungen des auffallenden Lichtes in Form der Fluorescenz gesellen.

b) Das mikroskopische Aussehen der Kolonien.

Noch mannigfaltiger sind die Unterschiede der Kolonien bei der Durchmusterung unter dem Mikroskop bei schwacher Vergrösserung. Die Lichtfülle, welche der Abbe'sche Beleuchtungsapparat bietet, ist hierbei genügend abzublenden. Wir begegnen hier einer Reihe von verwerthbaren Merkmalen. Die Ränder der Kolonien lassen Verschiedenheiten in mancher Hinsicht erkennen; sie können scharf geschnitten sein, oder sie sind durch unregelmässige Linien begrenzt, hier und da auch strahlenförmige Fortsätze oder Franzen aussendend. Mitunter ist die Grenzzone gegen die Gelatine hin nicht scharf abgesetzt, sondern sie schiebt sich über dieselbe, sich allmählich im Dickendurchmesser verjüngend, hin, so dass sie schliesslich das Bild eines äusserst zarten Häutchens darbietet. Das Zustandekommen dieser

Beobachtung erklärt sich durch ein fortkriechendes peripheres Oberflächen-Wachsthum der Kolonie; insofern dieses stärker ist als im Centrum, so kommt es zu wallartigen Aufwerfungen. Je nachdem sich dieser Vorgang gleichmässig am Umfang der Kolonie abspielt oder nicht, beobachten wir einerseits der Kreisform sich annähernde Figuren, oder andererseits gelappte Gebilde.

Ebenso wie der Körper, so ist auch die Oberfläche der Kolonien in ihrer Gestaltung eine wechselnde; bei den festwachsenden (zum Theil auch bei den verflüssigenden in ihren jüngsten Stadien) tritt eine verschiedenartige Körnung auf, welche als feinste Granulirung bis zu deutlich erkennbaren Unebenheiten in die Erscheinung tritt. Solche Bilder lassen sich namentlich durch eine geringe excentrische Stellung der Blende schön erzielen. Bei den verflüssigenden Bakterien führt die Bildung des Trichters in der Gelatine entsprechend dem Neigungswinkel desselben wechselnde Lichtbrechungserscheinungen herbei, welche je nach der tieferen oder oberflächlichen Einstellung als schwarze, in ihrem Durchmesser und ihrer Dicke sich verändernde Ringe erscheinen (Cholera auf Gelatine). Fernerhin verdient der Mittelpunkt der Kolonien besondere Beachtung; häufig ist der Bau derselben kein gleichmässiger, sondern es findet eine centrale Anhäufung der Bakterienmasse statt, die in Form eines mehr minder scharf begrenzten Kernes zu erkennen ist. Diese Erscheinung tritt bei beiden Wachstumsformen auf; bei den verflüssigenden findet sich oft noch eine speichenförmige Anordnung, welche durch dichte zusammengelagerte Massen hervorgerufen ist.

Noch deutlicher als mit dem unbewaffneten Auge sind unter dem Mikroskope Farbenunterschiede wahrzunehmen, dieselben wechseln von den sattesten Tönen bis zu den feinsten Nuancen. Man wird hier gut thun, selbst scheinbar geringe Abweichungen durch weitere Prüfung aufzuklären. Hierbei ist auch der Glanz der Farben und die Transparenz besonders zu berücksichtigen.

Was die Grösse der Kolonien betrifft, so erscheint im Allgemeinen die Annahme gerechtfertigt, dass unter den obwaltenden gleichen Ernährungs- und Entwicklungs-Bedingungen dieselbe bei gleichgearteten Individuen gleiche Dimensionen annehmen müsse; es treten jedoch bei dem Bakterienleben Umstände in den Vordergrund, welche eine solche Behauptung nicht für alle Fälle als zutreffend erscheinen lassen. Jeder Organismus erzeugt

Stoff  
zutri  
Stud  
da  
der  
ders  
gege  
der  
und  
such

c

lonie  
dure  
je na  
als  
in v  
auch

Prot  
berk  
oder  
im C

ordn  
eines  
solch  
Ober  
drüc  
meid  
den  
mehr  
hafte  
der

Form

Stoffwechselprodukte, deren Anhäufung ihm oder anderen nicht zuträglich ist. Derartige Verhältnisse sind durch biologische Studien in der Bakterienkunde wiederholt bekannt geworden; da sich die Diffusion solcher Stoffe im Nährboden nicht von der Hand weisen lässt, so müssen wir sogar an eine Fernwirkung derselben denken, um das Zurückbleiben gleichgearteter Kolonien gegenüber anderen zu erklären. Immerhin wird das Merkmal der Grösse zu würdigen sein, wengleich es in zweifelhaften und auffallenden Fällen der Bestätigung durch die weiteren Untersuchungsmethoden bedarf.

#### c) Die Beobachtung der Lagerung der Bakterien in der Kolonie.

Bei der Schilderung der Verschiedenheit der einzelnen Kolonien wird schon die Vermuthung aufgetaucht sein, dass diese durch die Art des Wachstums der Bakterien bedingt sein mag, je nachdem dasselbe als ein kettenförmiges Aneinanderreihen oder als Haufenbildung auftritt. In der That ist ihre Lagerung in in vielen Fällen bedingend für die Form der Kolonie und ist auch als Erkennungsmerkmal ab und zu zu verwerthen.

Das endständige Wachstum verleiht den Kolonien der Proteus-Arten, des Milzbrands, des Typhus-, Cholera- und Tuberkel-Bacillus ihre unregelmässige Grenzen, während die haufen- oder traubenförmige Anordnung mehr rundliche Koloniengebilde im Gefolge hat.

Die Methode, die einzelnen Bakterien in ihrer örtlichen Anordnung zur Anschauung zu bringen, ist durch die Fertigung eines „Klatschpräparates“ gegeben. Zur Herstellung eines solchen legt man ein wohlgereinigtes Deckglas auf eine an der Oberfläche der Gelatine oder des Agar befindliche Kolonie und drückt dasselbe sanft an, Verschiebungen dabei sorgsam vermeidend. Nach vorsichtiger Entfernung lässt man die anhaften Koloniereste in der Luft antrocknen und zieht das Deckglas mehrmals ziemlich rasch durch die Flamme, damit letztere anhaften. Die Färbung und Weiterbehandlung wird nach einer der später angegebenen Methoden (vergl. S. 143) bewerkstelligt.

#### d) Die Beobachtung der Form der Bakterien.

Schon durch das Klatschpräparat wird man sich von der Form der Bakterien überzeugen können; es ist jedoch angezeigt,

letztere gewissermaassen in isolirtem Zustande zur Anschauung zu bringen und dies wird durch das „Ausstrichpräparat“ erreicht. Zu diesem Behufe bringt man auf ein gereinigtes Deckglas\*) ein Tröpfchen destillirten (zweckmässig sterilisirten) Wassers. Mittelst eines Platindrahtes, welcher in das eine Ende eines Glasstabes eingeschmolzen ist („Platin- oder Impfnadel“) entnimmt man etwas von der zu untersuchenden Kolonie und streicht die haftengebliebenen Theilchen derselben gleichmässig auf dem Deckglas durch Verreiben aus. Man hüte sich, zu viel von der Kolonie zu verwenden, da die Lagerung der Bakterien leicht zu dicht wird. Vor der Entnahme muss die Platinnadel in der Flamme ausgeglüht sein, damit sie steril ist, und sie darf erst nach vollständiger Erkaltung verwendet werden. Ebenso wird man sie nach dem Gebrauche sofort ausglühen, um eine Verschleppung von (etwa pathogenen) Keimen zu vermeiden. Bei grossen Kolonien wird das Einsenken der Drahtspitze leicht mit unbewaffnetem Auge gelingen, bei kleinen dagegen ist man öfter genöthigt, sich schwacher Vergrösserungen des Mikroskopes zu bedienen. Man biegt sich dann die Spitze im schwachen Bogen nach abwärts und verfolgt deren Weg unter dem Mikroskop. Zur sicheren Führung der Platinnadel legt man die rechte Hand an den Objektisch oder auf eine Unterlage von der gleichen Höhe auf.

Um von einer Kolonie im Rollröhrchen zu entnehmen, biegt man die Spitze der Platinnadel etwas schräge. Bei der Einführung der Nadel in das Innere des Röhrchens ist darauf zu achten, dass man mit dem Glasstab die Gelatineschicht nicht berührt.

Sobald das Deckglaspräparat lufttrocken geworden ist, zieht man es mehrmals durch die Flamme, um die Bakterien zu befestigen, damit sie bei der nachfolgenden Färbung nicht abgespült

\*) Ein praktischer Vorschlag zur Aufbewahrung und Reinigung der Deckgläser mag an dieser Stelle noch Erwähnung finden. Dieselben sind meistens mit einer leichten, fettigen Schicht überzogen, sodass sich das Wasser beim Ausstreichen der Bakterien immer zurückzieht. Zur Beseitigung derselben bewahrt man die Deckgläser zweckmässig in einer mit Alkohol zum Theil gefüllten, verschliessbaren Glasdose; aus derselben entnimmt man sie kurz vor dem Gebrauche und reinigt sie mit einem Lappen von Putzleder.



werden. Erhitzt man zu stark, so erleiden die Bakterien eine Einbusse, Farbstoffe aufzunehmen. Ehe wir die Ausführung der Färbung schildern, müssen wir zunächst die Darstellung der Farblösungen beschreiben.

#### e) Die Darstellung der Farblösungen.

Die verschiedenen Methoden der Färbung der Bakterien verfolgen nicht nur den Zweck, ein besser erkennbares Bild derselben und deren Theile zu erreichen, sondern sie sind auch für manche Fälle als eine mikrochemische Reaktion aufzufassen und bilden in dieser Hinsicht ein werthvolles Glied in der Bakterien-diagnostik. Nicht alle Bakterien verhalten sich in ihrer Färbbarkeit gleichmässig; die einen nehmen den Farbstoff leicht, die anderen schwer auf, oder geben ihn in Alkohol, verdünnten Säuren u. dergl. wieder ab oder nicht. Auch hinsichtlich der Farbstoffe bestehen Unterschiede, indem der eine oder andere sich mehr oder weniger für eine Bakterienart eignet. Bezüglich solcher Einzelheiten muss auf die oben angeführten Werke bakteriologischer Diagnostik (S. 138) verwiesen werden. Sehr zahlreiche Farblösungen sind für bestimmte Zwecke zusammengestellt worden, zur Wasseruntersuchung sind drei für die meisten Fälle ausreichend; die Bereitung derselben soll im Nachfolgenden erörtert werden.

1. Die Löffler'sche alkalische Methylenblau-Lösung wird hergestellt, indem man 30 ccm konzentrierter alkoholischer Methylenblaulösung mit 100 ccm KalilaugeLösung von der Konzentration (1 : 10 000) versetzt.

2. Die Ziehl'sche Karbolsäure-Fuchsinlösung wird bereitet, indem man 1 g Fuchsin mit 100 ccm 5procentiger Karbolsäurelösung verreibt und hierbei nach und nach 10 ccm Alkohol hinzufügt.

3. Die Ehrlich'sche Gentianaviolettlösung. Die Darstellung derselben geschieht in folgender Weise. Man schüttelt 4 ccm Anilin (Anilinöl) mit 100 ccm destillirten Wassers kräftig durch, wobei ein Antheil des ersteren in Lösung geht; der ungelöste ölige Rest wird durch Filtration mittelst eines angefeuchteten Filters abgeschieden. Zu dieser klaren Flüssigkeit werden 11 ccm einer konzentrirten alkoholischen Lösung von Gentianaviolett unter Umschütteln hinzugesetzt. Die Farbstoff-

lösung setzt in der ersten Zeit Farbniederschläge ab und kann deshalb erst nach 24 Stunden in Gebrauch genommen werden.

Zur Unterscheidung mancher Bakterienarten ist die von Gram angegebene Färbungsmethode sehr geeignet. Nach seiner Vorschrift färbt man zuerst 1—2 Minuten in Ehrlich'scher Gentianaviolettlösung, und legt dann das abgespülte Präparat 1 Minute lang in eine Jod-Jodkalilösung, welche aus 1 Theil Jod, 2 Theilen Jodkali und 300 Theilen Wasser besteht, bringt dasselbe hierauf in absoluten Alkohol für einige Minuten bis zur eingetretenen vollständigen Entfärbung. Hierdurch ist beispielsweise der Typhusbacillus von anderen Keimen zu unterscheiden; dieser wie auch der Choleravibrio und der Milzbrandbacillus färben sich durch dieses Verfahren nicht oder, besser gesagt, sie geben hierbei den aufgenommenen Farbstoff wieder ab.

Zur Aufbewahrung der Farblösungen ist zu bemerken, dass es sich empfiehlt, diese in kleinen 100 ccm fassenden Arzneiflaschen zu halten, deren durchbohrter Stöpsel mit einem unten zu einer Spitze ausgezogenen Glasrohr nach Art einer Pipette versehen ist. Letztere darf nie ganz bis zum Grunde der Flasche reichen, um etwaige Farbniederschläge nicht mit aufzunehmen.

Wenn es sich darum handelt, eine einfache Färbung der Bakterien vorzunehmen, so giebt man auf die Deckglasfläche, an der sie haften, einige Tropfen Farblösung, so dass sie von derselben bis zu ihren Rändern vollständig bedeckt ist. Nach einigen Minuten ist eine hinreichende Tinktion der Keime erfolgt. Will man den Vorgang beschleunigen oder eine intensivere Färbung erzielen, so erhitzt man die Farblösung, bis sie zu dampfen beginnt, indem man das Deckglas mit einer Pincette fasst und wagrecht über einer Flamme hin und her bewegt. Hierauf spült man das Deckglas ab, legt es mit der gefärbten Fläche auf einen Objektträger und entfernt das überschüssige Wasser durch Aufdrücken von Filtrirpapier. Das Präparat ist nunmehr zur Betrachtung fertig, welche bei offenem Abbe'schen Kondensor geschieht.

Die Sporen widerstehen dieser Färbung; sie nehmen die Farbe nur bei längerer Andauer eines höheren Hitzegrades auf. Zu diesem Behufe giebt man in ein Porzellanschälchen die Farblösung (am besten die Ziehl'sche), legt das Deckglaspräparat hinein und erhitzt bis zum Sieden; nach einer Pause von 1 Minute

wiederholt man den Vorgang und führt ihn in dieser Weise ungefähr fünfmal aus. Das Präparat kommt hiernach 1 Minute lang in 3 procentigen Salzsäurealkohol, worin sich die vegetativen Formen entfärben. Nach dem Auswaschen kann man diese mit einer Kontrastfarbe (Methylenblau) nachfärben. (Günther.)

Eine besondere Technik erfordert die Färbung der Geisseln, welchen die Bakterien ihre Bewegung verdanken. Um das Abreißen derselben thunlichst zu vermeiden, muss man bei dem Ausstreichen der Bakterienmasse auf dem Deckglas sehr vorsichtig zu Werke gehen und unnöthiges Verreiben unterlassen. Zur Erzielung der Aufnahme des Farbstoffs ist eine Beizung vor auszuschicken. Nach Löffler's Angabe, dem Entdecker dieser Färbemethode, besteht diese Beize aus 10 ccm Tanninlösung (20 Tannin + 80 Wasser), welcher 4 ccm kaltgesättigter Ferrosulfatlösung zugesetzt sind; zu 16 ccm dieser Beize giebt man tropfenweise 1 procentige Natriumhydratlösung, bis man für die jeweilige Bakterienart die beste Beizkraft erreicht hat. Alte Beizen wirken besser als frisch bereitete. Die Färbung führt man zweckmässig mit Ziehl'scher Lösung oder einem anderen gut tingirenden Farbstoff aus. Zur Fertigung von guten Präparaten empfehlen sich besonders junge Kulturen. Im Uebrigen weicht die Behandlung des Präparates von der vorher geschilderten nicht ab.

#### f) Die Beobachtung der Bakterienbewegung.

Wie schon erwähnt, kommt manchen Bakterienarten die Fähigkeit einer Eigenbewegung zu. Die Beobachtung derselben unter dem auf planem Objektträger aufliegenden Deckglase führt zu häufigen Täuschungen, da bei dieser Anordnung durch die Verdunstung am Rande kapillare Strömungen des Wassers verursacht werden, durch deren Bewegung mechanische Ortsveränderungen der Bakterien veranlasst werden. In zuverlässiger Weise kann man sich über die Eigenbewegung nur durch die Besichtigung der Bakterien im hängenden Tropfen orientiren. Um einen solchen unter dem Mikroskop betrachten zu können und ihn zugleich gegen Verdunstung zu schützen, ist eine kleine Kammer, der hohl geschliffene Objektträger, ersonnen worden. In einen Objektträger von gutem weissen Glase ist eine muldenförmige Vertiefung eingeschliffen. Den Rand derselben bestreicht man mit Vaseline und drückt darauf das Deckglas mit dem

hängenden Tropfen. Die Herstellung des letzteren bewirkt man in der Weise, dass man auf das Deckglas ein kleines Tröpfchen Wasser giebt und hierin Theilchen einer Kolonie oder Reinkultur versenkt. Zunächst wählt man sich eine dickere Stelle mit schwacher Vergrößerung aus, stellt diese mit der Oelimmersion ein und sucht dann am Rande des Tropfens einen Punkt, an welchem die Bakterien nicht so dicht liegen, damit man die Bewegung der einzelnen gut verfolgen kann. Es ist hierbei, wie überhaupt bei ungefärbten Präparaten, stets mit enger Blende zu arbeiten. Sterilisirt man das Deckglas vor dem Gebrauche und verwendet statt des Wassers Nährbouillon, so stellt der hohlgeschliffene Objektträger eine Art feuchter Kammer dar, in welcher man das Wachstum der Bakterien mehrere Tage hindurch verfolgen kann.

Die Bewegungen, welche hierbei zur Beobachtung gelangen, sind der verschiedensten Art; theils sind sie drehend oder in geradliniger oder gewundener Richtung; es zeigt sich auch ein den Mückenschwärmen ähnliches Bild und dergleichen mehr.

#### g) Die Beobachtung der Bakterien als Reinkultur bei verschiedenen Nährmedien und Temperaturen.

Ein ganz hervorragender Werth für die Bakteriendiagnose muss der Anlage der „Reinkultur“ zugemessen werden. Zwar lieferte uns eine solche schon das getrennte Wachstum auf der Kulturplatte, jedoch ist die Möglichkeit, das Verhalten der einzelnen Keimarten unter wechselnden Bedingungen zu beobachten, erst durch eine Isolirung derselben gegeben. In der gleichen Weise wie zu Färbezwecken entnimmt man kleinste Theilchen der Kolonie mit der Platinnadel und verimpft sie auf verschiedene Nährböden. Bei den festen, durchsichtigen Nährböden wird man die Art der Verimpfung anders gestalten, je nachdem man Oberflächen- oder Tiefen-Wachsthum erzielen will.

#### Die Stichkultur.

Zur Herstellung von Stichkulturen finden Nährgelatine und Agar (selten geronnenes Blutserum) Verwendung; die genannten Nährmedien befinden sich hierbei stets im Reagenzglase. Man fasst das Reagenzglas zwischen Daumen und Zeigefinger der linken Hand, so dass die Mündung desselben nach unten steht, ent-

fernt den Wattedropfen und klemmt ihn zwischen zwei Finger der gleichen Hand, indem man vorsichtig darauf achtet, dass nur die vorher ausserhalb des Glases befindlichen Theile der Watte berührt werden. Hierauf nimmt man von der zu verimpfenden Kolonie mit der ausgeglühten Platin-(Impf-)Nadel etwas ab und senkt letztere 2—2,5 cm in das Nährmedium senkrecht ein. Nach Entfernung der Nadel setzt man den Wattedropfen wieder auf. Sollte man nicht sicher sein, dass inzwischen eine Infektion des letzteren durch die Finger stattgefunden hat, so entzündet man denselben und brennt ihn oberflächlich ab.

#### Die Strichkultur.

Die Strichkultur kann man im Reagenzglase, oder in Glasdosen mit allen festen Nährböden anlegen. In ersterem Falle verfährt man ebenso wie vorher, nur wird man anstatt des Stiches einen Strich auf der Oberfläche des Nährmediums von hinten nach vorn ausführen. Insofern es erwünscht ist, eine solche Reinkultur unter dem Mikroskope zu beobachten, ist es zweckmässig, auf einem Objektträger, welcher im Heissluftschrank sterilisirt worden ist, Gelatine oder Agar auszugliessen und hierauf nach der Erstarrung in der geschilderten Weise zu impfen. Solche Objektträgerkulturen wird man zum Schutze gegen Verunreinigung und Eintrocknung in der feuchten Kammer aufbewahren.

#### Die Bouillonkultur.

Das Bouillonröhrchen wird in schräger Stellung vorsichtig geöffnet und unter gleichen Vorsichtsmaassregeln gegen äussere Verunreinigung inficirt.

Es ist angezeigt, immer mehrere Reinkulturen der gleichen Art (Stich-, Strich- oder Bouillonkultur) anzulegen. Insofern Unterschiede in den Wachsthumerscheinungen auftreten, so besteht der Verdacht, dass die Reinkultur durch zufällige Beimengung anderer Bakterienarten verunreinigt ist und demgemäss das Prädikat einer solchen nicht mehr verdient. In zweifelhaften Fällen wird man sich durch Anlage von Plattenkulturen hiervon überzeugen. Man impft deshalb von der Reinkultur weg ein Gelatineröhrchen und verflüssigt es bei 37°; durch vorsichtiges Schwenken sucht man eine gleichmässige Vermischung der zugeführten Bakterien mit der Gelatine zu erzielen. Mit

einer ausgeglühten Platinöse überträgt man ungefähr 6 Oesen in ein zweites Röhrchen verflüssigter Gelatine, und nach hinreichender Mischung von hier in ein drittes solches. Sämmtliche Röhrchen werden zu Platten ausgegossen. An dem Wachstum derselben kann man nunmehr konstatiren, ob nur eine oder mehrere Arten von Keimen vorliegen. Diese Verdünnungsmethode eignet sich zur Scheidung von Bakterienmischen überhaupt.

Bei der Besichtigung der Reinkulturen begegnen wir den verschiedensten Bildern; immer wird jedoch darauf zu achten sein, die Gleichheit oder Aehnlichkeit unter gleichen obwaltenden

äusseren Bedingungen, insbesondere der Zeit und der umgebenden Temperatur, zu verzeichnen. In letzterer Hinsicht wird die Benutzung eines Brutschrankes unerlässlich, dessen Einrichtung die Einhaltung einer konstanten Temperatur während eines gewünschten Zeitraumes ermöglicht. Um dieses zu erreichen, sind Brutschränke der verschiedensten Form und Art konstruirt worden; in der Hauptsache beruht das Princip derselben darauf, einen Hohlraum zu gestalten, bei welchem die Wärmeabgabe nach aussen durch Isolirsichten auf ein Minimum reducirt ist. Zur Uebertragung der von einer Flamme gelieferten Wärme dient das Wasser, welches sich zwischen den doppelten Wandungen des Schrankes befindet. Unvermeidliche Wärmeverluste gleicht ein Thermoregulator aus. Die einfachste Konstruktion

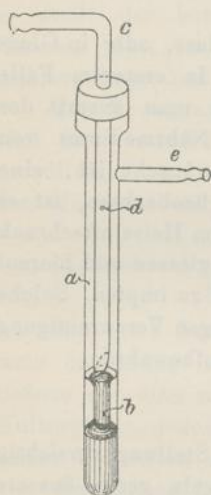


Fig. 74.

eines solchen zeigt die nebenstehende Fig. 74. In ein einfach tubulirtes, unten geschlossenes Rohr a von der Form eines Reagenzglases ist ein Trichter b eingeschmolzen, welcher den Hohlraum in einen oberen und unteren Theil scheidet. In diesen Trichter ragt ein oben rechtwinklig abgebogenes Glasrohr c, das in einem durchbohrten Korke verschiebbar ist. Letzteres ist an seinem unteren Ende schräg abgeschliffen und trägt über demselben eine kleine seitliche Oeffnung d. Der Apparat wird in Stand gesetzt, indem man nach Entfernung des Rohres c zunächst etwas Alkohol und dann einige Kubikcentimeter Queck-

silb  
Rau  
in a  
leit  
leuc  
Der  
dich  
Län  
vorl  
und  
die  
oder  
bei  
seitl  
von  
met

Bak  
wes  
zeic  
a är  
gen  
Nan

vers  
gege  
an  
glüh  
sirte  
der  
blei  
verw

man  
dam  
und  
abs

silber eingiesst; durch letzteres wird der Alkohol in dem unteren Raum von a abgeschlossen. Hierauf fügt man das Rohr c wieder in a ein, verbindet es mit dem Zuführungsschlauche der Gasleitung und stellt anderseits bei e die Verbindung mit einem leuchtenden, unter dem Brutschrank befindlichen Brenner her. Der Apparat wird durch eine Oeffnung in den Brutschrank luftdicht eingesetzt, so dass er jedenfalls zu Zweidritttheil seiner Länge in das Innere desselben hineinragt. Durch die daselbst vorhandene Wärme wird der Alkohol zum Theil dampfförmig und drückt das Quecksilber im Trichter b in die Höhe, wobei die schräg abgeschliffene Ausflussöffnung des Rohres c mehr oder minder verkleinert wird. Um ein Verlöschen der Flamme bei vollständigem Verschluss derselben zu verhindern, ist das seitliche Loch d angebracht. Durch entsprechende Verschiebung von c regulirt man die Temperatur, welche durch ein Thermometer zu kontroliren ist.

#### h) Der Ausschluss von Sauerstoff bei der Züchtung.

Das Bedürfniss nach freiem Sauerstoff kommt nicht allen Bakterien in gleicher Weise zu; manche gedeihen bei der Anwesenheit desselben, man hat diese Arten als Aëroben bezeichnet, andere wachsen nur bei dessen Ausschluss, die Anaëroben, während wieder andere sowohl bei wie ohne Gegenwart von Sauerstoff auskeimen, welch' letzteren man den Namen der fakultativen Anaëroben beigelegt hat.

Um diese Unterschiede herauszufinden in Fällen, wo man verschiedene Bakterienarten vor sich hat, ist die von Koch angegebene Methode brauchbar. Man legt eine Objektträgerkultur an und bedeckt dieselbe vor dem Erstarren mit einem ausgeglühten Glimmerplättchen oder einem in gleicher Weise sterilisirten Deckglas. Die letzten Tropfen von Gelatine, welche bei der Anlage der eigentlichen Kulturplatte im Reagenzrohr verbleiben, sind zur Herstellung solcher „kleiner Platten“ praktisch verwendbar.

Zur Fernhaltung des Sauerstoffes von Reinkulturen kann man verschiedene Wege einschlagen. Man kann die Luft und damit denselben durch Einleitung eines anderen Gases verdrängen und hiernach das Reagenzrohr luftdicht abschliessen, oder besser abschmelzen. Nach den Versuchen von C. Fraenkel eignet sich

hierzu das Wasserstoffgas am besten; Kohlensäure führt oft eine Verzögerung des Wachstums herbei. Man kann ferner auch zum Ziele gelangen, wenn man die Stichkultur nach ihrer Anlage mit einer Schicht steriler Gelatine übergiesst<sup>1)</sup>, oder einen sehr tiefen Stich in Gelatine- oder Agar-Röhrchen anlegt. In letzterem Falle legen sich die Flächen des Stichkanals aneinander und verhindern den Zutritt der Luft von oben her; für diese Zwecke wird man die Reagenzröhrchen mit ungefähr 20 ccm statt mit 10 ccm des betreffenden Nährbodens füllen, um eine möglichst hohe Säule zu gewinnen.

Nach Buchner's Vorschlag kann man den Sauerstoff durch eine alkalische Lösung von Pyrogallol absorbiren. Derselbe stellt die Kulturen in ein wohlverschlossenes Gefäss von einem Rauminhalt von ungefähr 200 ccm, in welchem sich eine Lösung von 1 g Pyrogallol, 1 ccm Liq. Kali caustici und 10 ccm Wasser befindet. Diese Methode eignet sich nicht nur zur Züchtung in der Reinkultur, sondern auch in Rollröhrchen.

#### i) Das Thierexperiment.

Die Entscheidung, ob die vorliegende Reinkultur pathogene Eigenschaften besitzt oder nicht, kann nur durch das Thierexperiment herbeigeführt werden. Die Einverleibung der zu prüfenden Mikroorganismen in den thierischen Körper kann auf verschiedene Weise geschehen. Die am meisten geübte Art ist die subkutane Impfung. Eine Stelle des Thierkörpers am Rücken oder der Bauchfläche (bei Mäusen stets in der Nähe der Schwanzwurzel) wird von den Haaren befreit und hierauf durch Waschung mit einer Lösung von 1<sup>0</sup>/<sub>100</sub> Sublimat sterilisirt. Das Sublimat entfernt man durch Nachwaschen mit Alkohol und diesen durch sterilisirtes Wasser. Hierauf wird mit ausgeglühter und wieder erkalteter Scheere eine Wunde angelegt und durch dieselbe das Bakterienmaterial mittelst einer Impfnadel unter die Haut eingeführt. Man soll letzteres ziemlich weit einschieben, was bei der Beweglichkeit der Haut auf dem Unterhautzellgewebe der Thiere leicht gelingt. Die Verklebung der Wunde mit Colloidum ist zweckmässig, jedoch nicht immer nothwendig.

<sup>1)</sup> Dieses Verfahren ist auch geeignet, die Gasbildung mancher Bakterienarten zu veranschaulichen. Das entstandene Gas drängt sich als Blasen zwischen die Gelatine oder hebt dieselbe in die Höhe.



Anstatt der Einführung des Bakterienmaterials mit der Impfnadel kann man auch eine Aufschwemmung desselben mit sterilisirtem Wasser oder eine Bouillonkultur an der in der beschriebenen Weise präparirten Hautstelle mittelst einer Pravaz'schen Spritze einspritzen. Selbstverständlich muss auch diese steril sein; bei den gewöhnlichen Spritzen lässt sich dies durch Ausspülen mit Sublimatlösung der obigen Konzentration und Nachwaschen mit Alkohol und sterilem Wasser erreichen; es sind jedoch auch Spritzen mit Asbeststempel konstruirt worden, welche die zweckentsprechenden Temperaturen im Heissluftschrank ertragen. Mit solchen Instrumenten kann man auch das Impfmateriale in die Bauch- oder Brusthöhle einführen. Man wird hierbei ebenso wie oben verfahren und nur die Nadel der Spritze in entsprechender Richtung und Tiefe einsenken.

In manchen Fällen wird es angezeigt sein, um die natürlichen Verhältnisse thunlichst getreu nachzuahmen, das Bakterienmaterial zu verfüttern. Zu diesem Zwecke wird man dasselbe dem Futter beimischen oder besser als Aufschwemmung oder Bouillonkultur mittelst der Schlundsonde in den Magen bringen. Die normalen Verdauungssäfte der Thiere weichen in ihrer Zusammensetzung meistens von der des Menschen ab. Es ist deshalb oft eine Vorbereitung des Thieres für die Infektion nothwendig. Meerschweinchen erweisen sich erst dann für Cholera empfänglich, wenn die Säure des Magensaftes durch Einführung von 5 ccm einer 5<sup>0</sup>/<sub>10</sub>igen Natriumkarbonatlösung abgestumpft und die peristaltischen Bewegungen durch Einspritzen von 1 ccm Opiumtinktur in die Peritonealhöhle pro 200 g Thier gehemmt worden sind.

Die dritte Methode der Infektion geschieht durch die Athmungswege. So interessant dieselbe für bestimmte Zwecke ist, so wird doch von einer Beschreibung derselben abgesehen, da diese bei der Untersuchung des Wassers nicht in Frage kommt und andererseits ihre Ausführung complicirte Apparate und Vorichtsmaassregeln erheischt.

Nach erfolgter Infektion eines Thieres besteht die nächste Aufgabe darin, die Krankheitssymptome zu beobachten und zu verzeichnen. Vor Allem ist hierbei das Verhalten des Versuchstieres, seine Beweglichkeit, Fresslust, die Beschaffenheit des Felles (Aufsträuben der Haare), das Aussehen der Augen,

die Art der Defäkation u. dergl. mehr maassgebend. Bei grösseren Thieren sind Aufzeichnungen über Puls, Athmung und Temperatur im Mastdarm zu machen. Nach erfolgtem Tode, welcher bei zu erwartender Genesung nach Umständen auf andere Weise herbeigeführt wird, ist der Nachweis der zugeführten Bakterienart im Blute oder den Organsäften zu führen. Dieser wird erbracht durch Anlage von Stich- und Strichkulturen, welche in ihrem Bild mit der ursprünglichen Reinkultur übereinstimmen müssen, bei zweifelhaften Befunden auch durch die Plattenkultur, wobei man die oben erwähnte Verdünnungsmethode (S. 148) anwendet. Oft genügt schon die Anfertigung von gefärbten Deckglaspräparaten, indem man Blut oder Gewebssaft auf Deckgläsern ausstreicht und färbt. (Vergl. S. 143.) Zur Vermeidung des Hinzutretens anderer Bakterien muss die Haut vor ihrer Eröffnung mit einer bakterientödtenden Flüssigkeit gereinigt werden, welche vor Beginn der Zerlegung des Thieres durch Alkohol und sterilisirtes Wasser wieder zu entfernen ist. Die Obduktion darf nur mit ausgeglühten Instrumenten vorgenommen werden.

Um die Lagerung der Bakterien ersichtlich zu machen, härtet man Organstückchen in absolutem Alkohol und fertigt hiervon Schnittpräparate mittelst eines Mikrotoms. Es würde zu weit führen, auf die Einzelheiten der jetzt gebräuchlichen Verfahren der Schnittmethoden und die Färbung der Schnitte des Näheren einzugehen; es muss vielmehr auf die diesbezüglichen Mittheilungen in der Literatur hingewiesen werden. Diese Lücke in einem Buche über Wasseruntersuchung ist um so mehr gerechtfertigt, als die Nothwendigkeit der Anfertigung von mikroskopischen Schnitten nur in speciellen Fällen auftreten wird.

#### 4. Einige Bemerkungen über den Nachweis von pathogenen Mikroorganismen.

Die Vorgänge, wie pathogene Mikroorganismen in den menschlichen Körper gelangen und daselbst krankheitserregend wirken können, sind die verschiedensten. Es ist die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, dass solche gelegentlich mit dem Wasser getrunken werden und unter günstigen Umständen zur Entstehung von Krankheiten die Ursache abgeben. Es ist daher die Prüfung des Wassers in dieser Hinsicht von hervorragender Bedeutung.

Die geschilderten Methoden zum Nachweis der Bakterien überhaupt sind für diese Zwecke nicht ausreichend. In den allerwenigsten Fällen werden die Krankheitserreger in einer solchen Anzahl vorhanden sein, dass sie bei dem geringen zur Untersuchung verwendeten Wasserquantum auf der Kulturplatte in einer solchen Menge auftreten, dass sie nicht bei der Durchmusterung übersehen werden können. Es ist ganz unvermeidlich, dass vereinzelte derartige Kolonien unter einer grossen Zahl solcher von Wasserbakterien sich der Beobachtung entziehen, so dass ihre Auffindung mehr ein Werk des Zufalls ist. Andererseits kommt noch hinzu, dass die Entwicklungsenergie der ersteren zumeist eine geringere ist, so dass sie von letzteren überwuchert werden. Diese Gefahr besteht um so mehr, da sich der Nachweis pathogener Mikroorganismen in den meisten Fällen auf Wasser erstreckt, welche an sich schon sehr verunreinigt sind.

Von den bisher erforschten Krankheitserregern kommt in dieser Beziehung der Typhusbacillus und der Choleravibrio vornehmlich in Betracht. Aber gerade bei diesen beiden Arten werden die Verhältnisse dadurch complicirt, dass ihr Hinzutreten zum Wasser mit gleichzeitiger Zuführung von Bakterien des Verdauungskanal und Fäulnisserregern durch Dejektionen, Erbrochenem oder verunreinigter Wäsche u. dergl. einhergeht. Im Nachfolgenden wird eine Schilderung gegeben, wie die Versuche zu gestalten sind, um den Nachweis dieser beiden Arten zu ermöglichen.

#### a) Der Typhusbacillus.

Die Beobachtung, dass sich diese Bakterie verdünnten Lösungen von Karbolsäure gegenüber resistenter verhält als andere, hat zu ihrem Nachweis Verwendung und auch neben vielen anderen Methoden am meisten Anklang gefunden. Hierdurch werden von vornherein eine Reihe anderer Keime vom Wachstum ausgeschlossen. Von den sehr zahlreichen Vorschlägen seien nur einige erwähnt. Chantemesse und Vidal bedienten sich einer Nährgelatine, welcher 0,2% Karbolsäure zugesetzt war. Thoinot versuchte den Gehalt an übrigen Keimen herunterzudrücken, indem er einen halben Liter des Wassers mit 20 Tropfen Karbolsäure versetzte und erst nach einigen Stunden Platten nach obigem Princip anlegte. Die Methode von Vincent und Parietti, eine Anreicherung des Wassers anzustreben, wurde von Géré insofern

verbessert, als letzterer grössere Wassermengen unter ähnlichen Versuchsbedingungen anwandte. Derselbe versetzte 830 ccm Wasser mit 100 ccm neutraler, steriler Rindsbouillon, 50 ccm neutraler Peptonlösung und 20 ccm einer 5% Karbolsäurelösung. Das Ganze wird dann während 15—30 Stunden bei einer Temperatur von 32—36° gehalten; tritt eine Trübung der Flüssigkeit ein, so werden von derselben Platten mit gewöhnlicher Gelatine angefertigt. Holz bereitet mit dem frisch ausgepressten Saft roher Kartoffeln eine Gelatine, deren Säuregrad so gestellt war, dass 10 ccm 2,4 bis 3,2 ccm Zehntelnormalalkali zur Neutralisation benötigten. In dieser Gelatine wird das Wachstum anderer Bakterien zeitlich in einem höheren Grade verzögert, als das der Typhusbacillen. Noch mehr ist dies der Fall nach einem Zusatze von 0,05% Karbolsäure, insbesondere werden hierdurch Schimmel- und Hefepilze im Wachstum zurückgehalten.

Die meisten Aussichten auf Erfolg dürfte eine kombinierte Verknüpfung einiger der erwähnten Methoden bieten, indem man zunächst eine Anreicherung an Typhusbakterien nach Géré anstrebt und den Nachweis derselben mittelst der Holz'schen oder Chantemesse-Vidal'schen Gelatine zu führen versucht. Bei der zur Zeit noch bestehenden Unsicherheit der Charakteristik des Typhuserregers wird nur ein positives Ergebniss Anspruch auf Giltigkeit haben können und dies nur dann, wenn die Identität der gezüchteten Bakterienart mit typhusähnlichen, wobei das Bacterium coli vornehmlich zu berücksichtigen ist, mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann. Es ist hierbei Vorsicht im Urtheil umsomer geboten, weil der Typhusbacillus bei diesen Behandlungsweisen Veränderungen seiner Form und Eigenschaften, speciell der Beweglichkeit annimmt, welche bei den sonst üblichen Züchtungsweisen nicht in dem Maasse beobachtet werden. Bezüglich der Unterscheidungsmerkmale muss auf die Specialliteratur verwiesen werden.

#### b) Der Cholera vibrio.

Der Nachweis der Cholera bakterien im Wasser durch das Gelatineplattenverfahren in der üblichen Methode hatte bisher nur vereinzelte Erfolge zu verzeichnen, so dass eine Aenderung der Methode in diesem Falle angezeigt schien, um so mehr, da neben der unvermeidlichen Unsicherheit der nöthige Zeitaufwand

meist zu einer Verspätung der entsprechenden Maassregeln führte. Bei der oft rapiden Ausbreitung, welche Choleraepidemien nehmen, ist der möglichst frühzeitige Nachweis der Choleraerkrankungen in verdächtigem Wasser von grösstem Belang. Nach einem von R. Koch im 14. Band der Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten mitgetheilten Vorschlage kann man schnell und sicher in folgender Weise zum Ziele gelangen:

„ . . . Möglichst grosse Mengen des Wassers werden verarbeitet und zwar in der Weise, dass dem Wasser unmittelbar eine genügende Menge von Pepton und Kochsalz (von jedem 1 Proc.) zugesetzt wird. . . . Die Mischung wird dann bei 37° gehalten. Nach 10, 15 und 20 Stunden sind von der Peptonkultur Agarplatten zu beschicken. Die mikroskopische Untersuchung der Peptonkultur ist in diesem Falle von untergeordneter Bedeutung, da man fast aus jedem Wasser auf die angegebene Weise gekrümmte Bakterien heranzüchtet, welche den Choleraerkrankungen morphologisch sehr ähnlich sind. Dagegen werden alle ihrem Aussehen nach verdächtigen, auf der Agarplatte zur Entwicklung gekommenen Kolonien zuerst mikroskopisch geprüft und, sofern sie aus gekrümmten Bakterien bestehen, weiter gezüchtet zur Anstellung der Indolreaktion und des Thierversuches, welche bei Wasseruntersuchungen unter allen Umständen die Diagnose vervollständigen müssen. Nach den bisherigen Erfahrungen scheint es zweckmässig zu sein, die zu prüfende Wassermenge nicht grösser als etwa 100 ccm zu nehmen und besser eine Anzahl Einzelproben zu verarbeiten, als über diese Menge hinauszugehen.“

Es erübrigt noch die in dieser Vorschrift bezeichneten Verfahren des Näheren wiederzugeben, wie sie an der angeführten Stelle geschildert werden.

Die Agarplatte wird man in diesem Falle nicht anlegen, indem man die von der Peptonkultur entnommene Probe mit dem verflüssigten Agar vermischt und letzteres dann ausgiesst; es wird vielmehr das sterile Nähragar in eine Petri'sche Schale ausgegossen, und auf diese nach dem Erstarren die von der Oberfläche der Peptonkultur entnommene Flüssigkeit mittelst einer Platinöse ausgestrichen. Hierdurch erzielt man oberflächlich liegende Kolonien, welche für die weitere Behandlung leicht zugänglich sind. Die Agarplatten werden bei 37° gehalten. Das Wachstum der Choleraerkrankungen charakterisirt sich durch „mässig grosse Kolonien mit einem eigenthümlichen, hell graubraunen transparenten Aussehen, während fast alle anderen hier in Frage kommenden Bakterien weniger transparente Kolonien bilden“.

Das Agar scheidet bei seiner Erstarrung an der Oberfläche eine wässrige Flüssigkeit aus. Da diese die Entwicklung einzeller Kolonien beeinträchtigt, so soll man die gegossenen Petri'schen Schalen einige Tage lang vor ihrer Benutzung im Brutschrank halten, damit die Flüssigkeit verdunstet (Koch).

Die Indol-(Choleraroth-)Reaktion, welche von Bujwid und auch von Dunham entdeckt worden ist, beruht darauf, dass bei Gegenwart von Indol und salpetriger Säure durch Schwefelsäure eine Rothfärbung hervorgerufen wird. Für das Eintreten derselben sind aber ganz bestimmte Vorsichtsmaassregeln nothwendig.

Koch sagt hierüber:

„Vor allen Dingen muss man sich ein geeignetes Pepton beschaffen, denn nicht jede Sorte Pepton liefert gleich gute Resultate. Wahrscheinlich ist diese Differenz, wie Bleisch nachgewiesen hat, darin begründet, dass Peptonsorten, welche die Reaktion nicht gut geben, entweder einen zu geringen oder einen zu grossen Gehalt an Nitraten haben. Entweder muss man daher durch Vorversuche ein geeignetes Pepton auffinden und sich davon einen genügenden Vorrath beschaffen, oder man kann auch mit nitratarmen bezw. nitratfreien Peptonen, sofern man solche bekommen kann, nach dem Vorschlage von Bleisch Nitrat in entsprechender Menge zusetzen. Ein zweites Erforderniss für die Zuverlässigkeit der Reaktion ist, dass die zur Verwendung kommende Schwefelsäure vollkommen frei von salpetriger Säure ist. Als dritte Bedingung gilt, dass die Reaktion nur mit einer Reinkultur von Cholerabakterien angestellt wird. Wenn dies nicht der Fall ist, dann bleibt beim Gelingen des Experimentes der Einwand, dass von anderen Bakterien das Indol oder die salpetrige Säure herrührt, nicht ausgeschlossen. Da die Reaktion mit Kulturen, die in Fleischbrühe, auch wenn sie peptonhaltig ist, gewachsen sind, nicht so gleichmässig und deutlich ausfällt, so sollte dieselbe stets mit Kulturen in einer Peptonlösung angestellt werden.“

Der Thierversuch wird hierbei nicht durch Einführung des Impfmateri als in den Verdauungskanal, sondern durch intraperitoneale Einspritzungen bewerkstelligt. Nach dem Vorschlag R. Pfeiffer's soll man einem Meerschweinchen von 300—350 g Körpergewicht ungefähr 1,5 mg der Kultur in die Bauchhöhle spritzen. Diese Dosis genügt, um den Tod herbeizuführen; bei grösseren Thieren muss sie stärker genommen werden. Nach seiner Vorschrift nimmt man diese Kulturmenge mit einer Platinöse der entsprechenden Grösse von der Agaroberfläche ab, verdünnt mit

1 cem steriler Bouillon und bringt sie mittelst steriler Pravaz'scher Spritze in die Bauchhöhle. Die Vergiftungserscheinungen treten schon nach  $1\frac{1}{2}$  bis 2 Stunden auf; sie charakterisiren sich zuerst durch grosse Unruhe des Thieres und nachherige Muskelschwäche; das Thier nimmt meist die Seitenlage ein. Die Temperatur sinkt um  $2-3^{\circ}$ , wobei sich eine grosse Hinfälligkeit des Thieres bemächtigt. Die hinteren Extremitäten erscheinen gelähmt, von Zeit zu Zeit treten fibrilläre Zuckungen in den Muskeln auf. Das Thier fühlt sich nunmehr kalt an; die Temperatur kann im Mastdarm unter  $30^{\circ}$  sinken. Unter den geschilderten Erscheinungen erfolgt meistens der Tod nach 12 bis 16 Stunden.