III. Ueber eine Modification der bacteriologischen Plattenculturen.

Von Dr. H. Wilfarth.

Assistent an der Versuchsstation Bernburg.

Es ist allgemein bekannt, wie fördernd die Koch'sche Methode der Plattenculturen für die Bacterienforschung geworden ist und wie ausgezeichnet sich dieselbe zur Trennung der verschiedenen Bacterienarten bewährt hat. Die Methode leidet nur an zwei Uebelständen: erstens ist es nur schwer möglich, alle mit den Platten in Berührung kommenden Gegenstände, Glocken, Bänke etc. absolut sicher zu sterilisiren und bei den Manipulationen eine Luftinfection mit Sicherheit auszuschliessen, und zweitens gestattet die Gefahr der Luftinfection etc. nicht, die Platten häufig einer Beobachtung namentlich einer mikroskopischen Controle zu unterwerfen.

Es scheint mir daher für manche Zwecke vortheilhaft, die Culturen nicht auf Platten, sondern in flachen Flaschen vorzunehmen. Ich benutze dazu Flaschen aus dünnem, gleichmässig geblasenem Glase von der Form der gebräuchlichen flachen Brantweinflaschen. Dieselben sind wagerecht liegend von oben gesehen rund, nach dem Hals zu birnförmig auslaufend. Die beiden flachen Seiten sind möglichst parallel, 2—2½ cm von einander entfernt; der Hals ist 16—18 mm weit und ein wenig schräg nach oben gerichtet, um eine Benetzung des Wattepfropfens durch die Gelatine zu verhindern und um ein bequemes Einführen von Impfnadeln zu gestatten. Die Grösse richtet sich natürlich nach den Dimensionen des Objecttisches des Mikroskops; bei einem Durchmesser der flachen Seiten von 8 cm kann man 10 ccm Nährgelatine einfüllen.

Zur Ausführung der Culturen werden die Flaschen mit Wattepfropf im Trockenschrank sterilisirt, mit Nährgelatine versehen und dieselbe im Wasserbad oder Dampfapparat steril gemacht. Wenn man die Flaschen aufrecht, nebeneinander in einem passenden Korbe aus Drahtgeflecht in ein etwa viereckiges Wasserbad einsetzt, so lassen sich ohne viel Raum zu beanspruchen eine grössere Anzahl solcher Flaschen unterbringen.

Wenn das Impfmateriel mit der Gelatine vermischt ist, was in der Flasche viel leichter und gleichmässiger zu erreichen ist, als

¹⁾ Citirt bei Lacher l. c.

im Reagirglas, werden die Flaschen horizontal hingelegt und, wenn nöthig, mit Kautschukkappe verschlossen. Auch ohne Kappe ist übrigens bei gewöhnlicher Temperatur die Verdunstung nur unbedeutend; sie betrug durchschnittlich bei 15—18° C täglich 0,03 bis 0,09 g Wasser.

Um die Entwicklung der Bacteriencolonien beobachten zu können, legt man die Flasche umgekehrt, also (wie bei der Cultur im hängenden Tropfen) mit der Gelatineschicht nach oben, unter das Mikroskop und kann so, wenn die Gelatineschicht dünn ist, auch mittelstarke Systeme anwenden. Zur Betrachtung mit der Lupe, namentlich zum Zählen der Colonieen wende ich folgenden Apparat an: Die Flasche liegt mit der Gelatineschicht nach oben auf einem Ring, der mit 3 Füßen versehen ist; unter der Flasche steht eine innen geschwärzte Dose, die an ihrem oberen Rand einen verschiebbaren Hohlspiegel trägt. Durch die an einem Stativ befindliche Lupe sieht man durch die Flasche hindurch auf den dunklen, schwarzen Boden der Dose und beleuchtet zugleich durch den Spiegel die Gelatineschicht seitlich, so dass sich die weissen, schief beleuchteten Colonieen von dem schwarzen Grunde scharf abheben und man bei ziemlich schwacher Lupe doch die kleinsten Colonieen sehr deutlich sehen kann. Hat man Bacterien, welche die Gelatine verflüssigen, so ist das Umdrehen der Flasche nur in den ersten Stadien anwendbar; man kann in solchen Fällen niedrigere Flaschen anwenden und von oben beobachten, nachdem man etwaige Wassertropfchen, die sich an der oberen Wand gewöhnlich condensirt haben, durch Auflegen einer erwärmten Platte entfernt hat. Bei Culturen mit Agar-Agar tritt oft der Uebelstand auf, dass die Schicht nicht am Glase haftet und bei nicht ganz horizontaler Lage sich verschiebt; doch ist bei Anwendung von Lösungen mit 1½ % Agar die Verschiebung gering. Eine Mischung von Agar und Gelatine leistet bessere Dienste; eine Lösung mit ¾ % Agar und 5 % Gelatine haftet gut am Glase und hat auch sonst manche Vortheile, so z. B. erstarrt diese Mischung um einige Grade niedriger, als reine Agarlösungen. Schon ganz geringe Mengen Agar, 0,2 % der Gelatine zugesetzt, verhindern ein vollständiges Flüssigwerden derselben, ohne doch die Wirkung der verflüssigenden Bacterien ganz unsichtbar zu machen; es scheint mir eine solche Mischung auch unter Umständen bei etwas höheren Temperaturen brauchbar zu sein.

Zum Einfüllen der Nährgelatine in die Flaschen habe ich mir einen Scheidetrichter fertigen lassen, der gestattet, jedesmal eine bestimmte Menge zuzugeben. Er hat unter dem grossen Gefäss, das zur Aufnahme der Flüssigkeit dient, noch eine kleinere Kugel oder mehr cylindrische Pipette von 10 cm Inhalt; in der Verengung zwischen den beiden Kugeln ist eine oben und unten offene Glasröhre eingeschliffen, während unterhalb der Pipette entweder ein Glashahn sich befindet, oder ein eingeschliffener Glasstab, der durch die Glasröhre hindurchgeht, den Verschluss bildet. Der Scheidetrichter und die Glasröhre werden mit Wattepfropfen oben verschlossen, im Trockenschrank sterilisirt, die Nährgelatine eingefüllt und die Pipette durch Aufheben des Glasstabes, resp. Oeffnen des Hahnes entleert, dann durch Aufheben der Glasröhre wieder gefüllt; der Glashahn gestattet ein etwas genaueres Arbeiten und bequemes Einfüllen, ist aber beim Sterilisiren dem Zerspringen mehr ausgesetzt. Die Pipette kann eine Marke oder Theilung haben, so dass man eine beliebige Anzahl Cubikcentimeter einfüllen kann. Will man mit stärkeren Vergrösserungen die Culturen beobachten, so muss man natürlich nur wenig Gelatine einfüllen, damit die Schicht ganz dünn ist.

Die Entnahme einer Bacteriencolonie zum Weiterimpfen ist aus der Flasche allerdings nicht so leicht, wie von der Platte, aber wenn der Hals nicht unter 16—18 mm weit ist und derselbe nur wenig schräg, etwa unter einem Winkel von 10—15 Grad nach oben gerichtet ist, so gelingt es gut und sicher, die gewünschte Colonie zu fassen; man benutzt wohl am besten Nadeln, die man sich aus dickem Platindraht fertigt und in geeigneter Weise biegt.

Die Vortheile der hier in Vorschlag gebrachten Flaschenculturen vor den gewöhnlichen Culturen auf Platten bestehen nun vor Allem darin, dass man Sicherheit gegen zufällige Infectionen hat, ferner, dass die Operationen leichter und einfacher auszuführen sind, da man keine Nivellir- und Kühlvorrichtung, Glocken etc. nöthig hat und endlich, dass man die Culturen zu jeder Zeit, sogar mit stärkeren Systemen beobachten kann, ohne, wie es bei den Platten der Fall ist, Luftinfection herbeizuführen. Handelt es sich darum, z. B. bei Wasseruntersuchungen, die Zahl der Bacterien in einem Medium festzustellen, so hat die Flaschencultur auch noch den Vorzug, dass man die Gesamtzahl der Bacterien erhält, während man sonst die im Probirglas verbleibenden Reste unberücksichtigt lassen musste.

Die hier erwähnten Apparate können durch die Firma D. R. Müncke, Berlin, Louisenstrasse 58 bezogen werden.