[Aus dem hygienischen Institut der Universität Breslau.]

Eine einfache Methode zur Isolirung anaërober Bacterien.

Von

Dr. S. Botkin
aus St. Petersburg.

Wenn das Studium der anaëroben Bacterienarten bisher nicht weiter gediehen ist, als es der Natur der Sache nach wohl zu wünschen wäre, so liegt das wesentlich an Mängeln der zu ihrer Reinzüchtung gebräuchlichen Methoden. Complicirtheit und starke Beanspruchung von Zeit, zu geringe räumliche Trennung der Colonieen, mangelhafte Zugänglichkeit der letzteren zum Zweck der mikroskopischen Beobachtung und Abimpfung — das sind die Fehler, welche in mehr weniger hohem Grade fast allen bisher angegebenen Methoden anhaften. Es würde hier zu weit führen, die Methoden von Liborius, Roux, Gruber, Buchner, Fränkel, Kitasato eingehender zu kritisiren. Jeder, der sich mit Züchtung von Anaëroben beschäftigt hat, wird zugeben müssen, dass sie alle von dem Ideal eines handlichen, leicht ausführbaren Verfahrens weit entfernt sind.

Entschieden brauchbarer ist eine Methode, welche in neuester Zeit von Blücher¹ beschrieben wurde. Das Princip derselben besteht darin, dass zunächst von dem zu untersuchenden Materiale in kleinen Schälchen Gelatine- oder Agarplatten hergestellt und diese dann in einem mit Wasserstoff erfüllten Raume gehalten werden. Die Plattenschalen werden auf einen kleinen Dreifuss von Draht auf den Boden einer grösseren Schale mit etwa 5^{cm} hoher Wandung gesetzt und mit einem glockenartigen Trichter überdeckt, dessen obere Oeffnung durch Kautschukschlauch mit

¹ *Diese Zeitschrift.* Bd. VIII.

einem Kipp'schen Apparat verbunden werden kann. Nun wird in die grössere Schale so lange von einer Mischung von 3 bis 4 Theilen Wasser und einem Theil Glycerin eingegossen, bis eine Absperrung des Inneren der Glocke von der äusseren Luft erreicht ist, und dann 15 bis 20 Minuten lang Wasserstoffgas durchgeleitet, das in Blasen durch die Sperrflüssigkeit entweicht. Schliesslich wird der zuführende Kautschukschlauch mittels Quetschhahnes verschlossen.

In den Blücher'schen Apparaten gedeihen, wie ich mich überzeugen konnte, exquisite Anaëroben, wie die Bacillen des Tetanus, malignen Oedems und Rauschbrandes ausgezeichnet. Doch ist das Arbeiten nach dieser Methode immer noch sehr zeitraubend, da man für jede einzelne Platte besonders 15 bis 20 Minuten Wasserstoff durchleiten muss. Ausserdem sind die Schälchen sehr klein, und die räumliche Trennung der Colonieen daher schwierig. Auch gefährdet jede Bewegung der Schälchen, z. B. der Transport nach dem Brütöfen, die sichere Absperrung der mit H gefüllten Glocke. Diese Erfahrungen veranlassten mich, zu versuchen, ob sich nicht in bequemerer Weise mehrere Platten von der gebräuchlichen Art und Grösse auf einmal in einem grösseren Raume den Bedingungen der Anaërobie entsprechend unterbringen liessen. Der Gedanke an sich war nicht neu. Schon Liborius¹ hatte denselben in Prof. Flügge's Laboratorium mit einem gewissen Erfolge zur Ausführung gebracht. Bei dem Liborius'schen Apparat war der hermetische Abschluss von der Aussenluft durch Aufpressen einer Glasglocke auf einen Gummiring erzielt; doch erwies sich dieser Verschluss oft unzuverlässig und ausserdem umständlich und nicht ohne Gefahr für die Glocke.

Dagegen gelang es mir, theils unter Benutzung der Blücher'schen Idee, den Abschluss durch eine Sperrflüssigkeit zu bewirken, theils durch Anbringung einiger sonstiger Modificationen, der Methode von Liborius volle praktische Brauchbarkeit zu geben. Besonders habe ich bei der Construction des Apparates versucht, denselben so einzurichten, dass er sich mit Hülfe der in jedem Laboratorium befindlichen gewöhnlichen Utensilien ohne Weiteres zusammenstellen lässt.

Der aus diesen Bemühungen hervorgegangene definitive Apparat ist folgendermassen eingerichtet:

In eine 20 bis 25^{cm} im Durchmesser haltende, nicht zu niedrige Glasschale *A* — wie solche in den Laboratorien zur Aufbewahrung von Kartoffelculturen u. s. w. gebräuchlich sind — ist eine kleine Drahtetagère *D* eingesetzt, auf welcher vier Petri'sche Plattenschalen übereinander Platz finden.

¹ Diese Zeitschrift. Bd. I.

Dieselbe wird bedeckt mit einer Glasglocke (gewöhnliche Käseglocke) *B*, deren Durchmesser etwa 2 bis 3 cm kleiner ist, als derjenige der Schale. Aus gleich zu erwähnenden Gründen darf die Glocke auf dem Boden des Gefäßes nicht ganz aufstehen, sondern es muss zwischen Glockenrand und Boden ein gewisser Zwischenraum bleiben. Es wird das am besten dadurch erreicht, dass man auf den Boden der Schale ein Kreuz von plattgehämmertem Bleirohr *E*, von etwa 1 cm Dicke, legt und auf diesem den Rand der Glocke ruhen lässt. Um die Glocke mit Wasserstoff füllen zu können, ist unter dem Rande derselben das U-förmig gebogene Rohr *F*, in der Weise, wie es untenstehende Figur zeigt, in das Innere der Glocke bis oberhalb des Drahtgestelles eingeführt. Der zweite Schenkel geht zwischen Glöcken- und Schalenwand in die Höhe und kann mit dem Kipp'schen Apparat verbunden werden. Das Rohr *F* besteht aus einem dünnen Kautschukschlauch, in dessen Lumen ein feiner, recht weicher und biegsamer Kupferdraht liegt. Einem solchen Schlauch kann man jede beliebige Form geben, wobei das Lumen immer erhalten bleibt. Man kann ihn daher z. B. auch leicht durch Ueberbiegen am oberen Rande der Glasschale so fixiren, dass er senkrecht stehen bleibt.

A äusserer Schale. *B* Glocke. *C* Bleirohr zur Beschwerung der Glocke. *D* Draht-
etagere. *E* Kreuz aus platt gehämmertem Bleirohr. *F* Kautschukschlauch mit Draht-
einlage zum Einströmen des Wasserdampfes. *G* Eben solcher Schlauch zur Abströ-
mung. *H* Waschflasche. *I* Ausströmungsöffnung.

Ausser dem erwähnten ist noch ein zweiter biegsamer Kautschuk-
schlauch *G* in die Glocke eingeführt, welcher jedoch bald oberhalb des
unteren Randes der Glocke endet. Derselbe soll dazu dienen, während
des Durchleitens des Wasserstoffes von Zeit zu Zeit zu controliren, ob
aller Sauerstoff entfernt ist, indem man das aus ihm ausströmende Gas
anzündet. Damit dieses gefahrlos geschehen kann, muss ein Rückschlags-

ventil eingeschaltet werden, am einfachsten in Form einer kleinen Waschflasche *H* von etwa 50^{cem} Inhalt, die zur Hälfte mit Wasser gefüllt ist. Das Abströmungsrohr der Wasserflasche ist zu einer feinen Spitze *J* ausgezogen, an welcher sich das Gas — selbst wenn Knallgas vorhanden — gefahrlos entzünden lässt.

Der Apparat wird nun folgendermassen benutzt. Zunächst wird das Innere der Glocke mit Sublimat ausgewaschen und das Sublimat durch Alkohol und Aether entfernt. Die Etagère zur Aufnahme der Petri'schen Schalen wird durch Ausglühen in der Flamme des Bunsenbrenners sterilisirt. Es werden dann von dem zu untersuchenden Material ganz in gewöhnlicher Weise in Petri'schen Schalen Gelatine- oder Agar-Agarplatten gegossen und diese über einander ohne Deckel auf die Etagen des Drahtgestelles gesetzt. Nachdem man letzteres in die Schale *A* eingesetzt hat, giesst man auf den Boden der Schale etwa 3^{cm} hoch Paraffinum liquidum, welches als Absperrflüssigkeit dienen soll. Als solche eignet es sich nach meinen Erfahrungen besser als das von Blücher empfohlene Glycingemisch. Es ist vollständig geruchlos und auch sonst indifferent, verdunstet nicht und zieht kein Wasser an, während die Blücher'sche Flüssigkeit diese beiden letzteren Eigenschaften bis zu einem gewissen Grade zeigt und deshalb, besonders bei längerem Aufbewahren der Platten, zu einer Austrocknung des Nährbodens Veranlassung giebt. Nach dem Eingiessen des Paraffins deckt man die Glocke, an deren innerem Rande die Schenkel des U-Rohres *F* und *G* schon in die Höhe geführt sind, über das Drahtgestell und kann nun mit der Durchleitung des Wasserstoffs beginnen. Um die Entfernung des Sauerstoffs noch zu unterstützen, setzt man auf das unterste Fach der Etagère eine Petri'sche Schale, welche mit concentrirter Pyrogallussäurelösung gefüllt ist. Unmittelbar vor dem Aufsetzen der Glocke wird zur Pyrogallussäure etwas Kalilauge gegeben. Man kann dann sicher sein, dass auch solche Spuren von Sauerstoff, welche etwa nach beendigter Wasserstoffdurchleitung aus dem Nährboden oder aus der Sperrflüssigkeit frei werden, wieder unschädlich gemacht werden.

Beim Beginn der Durchleitung des in gewöhnlicher Weise gewaschenen Wasserstoffs wird zunächst die Abströmungsöffnung durch einen Quetschhahn geschlossen. Wenn dann das Gas in die Glocke eintritt, so steigt der Druck in derselben an, und wenn er eine gewisse Höhe erreicht hat, tritt der Wasserstoff in grossen Blasen durch die Sperrflüssigkeit nach aussen. Auf diese Weise lässt man etwa 10 Minuten lang das Gas durch die Flüssigkeit hindurchperlen. Darauf öffnet man den Quetschhahn bei *J* und lässt nun das überschüssige Gas hier entweichen. Nach etwa zwei Minuten — wenn man annehmen kann, dass

die in der kleinen Flasche enthalten gewesene Luft entfernt ist — versucht man, das Gas bei *J* anzuzünden. Wenn reiner Wasserstoff in der Glocke enthalten ist, brennt dasselbe mit ruhiger, gleichmässiger Flamme, andernfalls unter knatterndem Geräusch. Ist letzteres der Fall, so schliesst man den Quetschhahn wieder und lässt das Gas wieder 5—10 Minuten durch die Flüssigkeit austreten, und wiederholt dann den Anzündungsversuch. So fährt man fort, bis die Flamme ruhig brennt. Meistens ist dieses — bei nicht zu grosser Glocke — schon nach 10—15 Minuten langem Durchleiten der Fall. Doch thut man gut, der Sicherheit halber dann den Gasstrom noch dieselbe Zeit weitergehen zu lassen, damit etwaiger im Nährboden absorbirter Sauerstoff möglichst austreten und aus der Glocke entfernt werden kann. Man braucht während dieser Zeit durchaus nicht immer den Apparat zu überwachen; wenn der Gasstrom einmal im richtigen Gange ist, kann man ihn ruhig sich selbst überlassen.

Ist die Durchleitung beendet, so schliesst man den Hahn des Kippischen Apparats und zieht die Kautschukschläuche *F* und *G* vorsichtig aus der Glocke heraus, eine Procedur, die bei hinreichend weichen Drähten ungemein leicht auszuführen ist. Dieses Herausziehen der Schläuche ist ein entschiedener Vortheil des neuen Verfahrens, da jedes Abschmelzen oder Absperren mit Quetschhähnen vermieden wird und man nunmehr als Abschluss gegen die Aussenluft nur mit der Sperrflüssigkeit zu rechnen hat.

Im Innern der Glocke bleibt nach dem Entfernen der Schläuche ein kleiner Ueberdruck bestehen, welchen man absichtlich belässt, da man in ihm eine werthvolle Controle für die Integrität des Luftabschlusses während der Vegetationsdauer der Platten besitzt. Um durch den Transport des Apparats den Verschluss nicht zu gefährden, stellt man denselben schon vor dem Durchleiten des Wasserstoffs an seinen definitiven Platz im Brütöfen oder in nächste Nähe des letzteren.

In dem neuen Apparat wachsen die bekannten pathogenen Anaeroben, malignes Oedem, Tetanus und Rauschbrand mindestens ebenso gut und kräftig und ebenso schnell, wie auf den Blücher'schen und Kitasato'schen Platten. Ebenso konnte ich darin verschiedene Bacterienarten aus verdorbener Milch isoliren, welche sich als exquisite Anaeroben herausstellten. Specifisch aërobe Bacterien, wie *B. fluorescens liquefaciens* und Rosahefe dagegen zeigten in dem Apparat kaum eine Spur von Entwicklung. Für die völlige Sicherheit des Sauerstoffabschlusses spricht auch, dass die unter der Glocke befindliche alkalische Pyrogalllösung nach 3—4 Tagen kaum stärker gebräunt erscheint, wie im Anfange.

So glaube ich denn dieses neue Verfahren als ein an Einfachheit, Zeitersparniss und Billigkeit alle bisher bekannten Methoden übertreffendes, an Sicherheit aber jenen mindestens ebenbürtiges, zur Züchtung von Anaëroben empfehlen zu dürfen. In der Praxis gestaltet sich dasselbe bei einiger Uebung entschieden noch einfacher, als es die Beschreibung vermuthen lässt. Sind ein für allemal die Vorbereitungen getroffen und die Gasentwicklungsapparate hergerichtet, so ist jetzt eine Anaëroben-isolirung nur sehr wenig umständlicher, wie die gewöhnliche Platten-cultur der Aëroben.