[Aus dem hygienischen Institute der deutschen Universität in Prag.]

Vorschläge und Anleitungen zur Anlegung von bacteriologischen Museen.

Von

Prof. Dr. J. Soyka und F. Král.¹

Das Bedürfniss, stets ein geeignetes Demonstrationsmaterial von Reinculturen für die Vorlesungen zu besitzen, lässt sich nicht immer leicht befriedigen. Unter den gewöhnlichen Verhältnissen gehen die Reinculturen durch Austrocknung, durch Verunreinigung rasch zu Grunde, und wenn nicht Hilfskräfte in ausgiebiger Zahl zur Verfügung stehen, wird es nicht leicht, stets die passenden Objecte für den Unterricht zur Hand zu haben. Es entwickelt sich nothwendiger Weise das Bestreben, diese rasche Vergänglichkeit der Präparate zu verhindern, was a priori schon nicht unmöglich erscheint, da ja in der Austrocknung und in der Verunreinigung mit fremden Organismen das schädigende Moment liegt, und beide sich vermeiden lassen, ohne dass der Gegenstand unserer Beobachtung sich entziehen muss.

Von diesen Gesichtspunkten ausgehend erfolgte im vorigen Jahre die Publikation eines Verfahrens, Reinculturen, hauptsächlich zu Unterrichtszwecken zu conserviren.² Diese Mittheilungen erfahren hiermit eine Erweiterung und Vervollständigung. Einerseits hat nämlich die seither verstrichene Zeit Gelegenheit zu neuen Erfahrungen über die Conservierungsdauer gegeben, die wieder dazu geführt haben, Verbesserungen und Vereinfachungen bei diesem Verfahren anzubringen; andererseits hat die am hygienischen Congress in Wien von Seite des im Titel genannten Institutes

¹ Herr F. Král hat einen wesentlichen Antheil an der technischen und constructiven Vervollkommnung der Methoden genommen.

² Soyka, Ueber ein Verfahren, Dauerpräparate von Reinculturen auf festem Nährboden herzustellen. *Centralblatt für Bacteriologie*. 1887. Bd. I. S. 542.

veranstaltete Ausstellung einer bacteriologischen Lehrmittelsammlung, in welcher ca. 50 verschiedene Reinculturen auf Kartoffeln und ca. 20 Reinculturen auf Gelatineplatten vertreten waren, Anlass gegeben zu mehrfachen Anfragen nach den Details der Methode, aber auch zur Aeusserung von Zweifeln und Missverständnissen, endlich auch direct zu Aufforderungen nach einer detaillirten Schilderung des hier angewandten Verfahrens, einer Beschreibung der Gefässe, Instrumente etc., welchen Umständen durch diese ausführlichere Publication Rechnung getragen werden soll. An der Hand des darin beschriebenen Verfahrens wird es leicht werden, solche Dauerpräparate anzufertigen.

I. Herstellung von Dauerpräparaten auf Kartoffeln.

Zur Anwendung hierbei gelangen jetzt cylindrische Glasdosen mit dicht aufgeschliffenen Glasdeckeln, welche einen Durchmesser von ca. 45^{mm} und eine Höhe von 22—25^{mm} incl. Deckel besitzen. Boden und Deckel sind innen möglichst plan geblasen und ausserdem an den Aussen-seiten plan geschliffen. Der Deckel ist auf dem Untertheile nicht in der allgemein üblichen Weise geschliffen, dass zum Zwecke des Aufschleifens durch einen geblasenen Absatz bereits vorgesorgt wäre; sondern die beiden Theile — Untertheil und Deckel — unserer Glasdosen haben vor dem Aufeinandererschleifen den gleichen äusseren und inneren Durchmesser. Der Absatz wird erst durch das Schleifrad am äusseren Umfange des Untertheiles ausgeschliffen, hierauf wird der Deckel an der inneren Seite in ähnlicher Weise behandelt und schliesslich direct auf den Untertheil aufgeschliffen.

Derart erhielten wir Dosen mit aufgeschliffenem Deckel, deren Innenraum vollkommen cylindrisch ist. Dies ist aus diesem Grunde, damit die Kartoffelscheiben an Wänden und Boden durch Reibungswiderstand und Adhäsion fest haften und die Culturen transportabel seien.

Zur Beschickung der Dosen mit kreisrunden Kartoffelscheiben, deren Durchmesser jenem der ersteren möglichst genau entspricht, dient nun ein besonderer Kartoffelbohrer, welcher den alten Cylinder-Handmicrotomen analog ist und ein exactes und rasches Arbeiten ermöglicht. Ein einem Korkbohrer nicht unähnlicher Cylinder aus Messing von 7^{cm} Länge, an der schneidenden, mit Facette versehenen Oeffnung ca. 39^{mm}, an der anderen, mit einem angelötheten Messingdraht als Rand versehenen Oeffnung ca. 41^{mm} im Durchmesser, ist mit einem passenden Stempel versehen, welcher zum Nachschieben der Kartoffel dient. Da die Glasdosen einen lichten Durchmesser von ca. 39^{mm} besitzen, so werden die mittelst des beschriebenen Kartoffelbohrers geschnittenen Scheiben ziemlich genau in dieselben passen.

Nachdem die Kartoffeln in bekannter Weise gereinigt, sterilisirt und gekocht wurden, schreitet man zum Schneiden der Scheiben. Man entfernt die Kuppe der Kartoffeln durch einen möglichst in einer Ebene geführten horizontalen Schnitt, mittelst eines blanken, besser noch polirten Kartoffelmessers, setzt den Bohrer an die Schnittfläche und schneidet durch eine drehende aber immer nach der gleichen Richtung ausgeführte Bewegung unter leichtem Druck einen Kartoffelcylinder heraus. Man schützt letzteren vor dem Herausgleiten durch den Stempel, fasst Bohrer und Stempel mit der linken Hand und schneidet nun mittelst des Messers Scheiben von 5—7^{mm} Dicke, indem man den Kartoffelcylinder mittelst des Stempels um ebenso viel weiter schiebt. Die Kartoffelscheibe bleibt nach ausgeführtem Schnitt auf dem Messer liegen und wird direct — ohne weitere Berührung — vom Messer in die vorher bei 150° sterilisirte Glasdose gleiten gelassen und hierauf eventuell mittelst des Stempels festgedrückt. Nun werden die gefüllten Kartoffeldosen in runde Drahtkörbe gestellt, bei 100° im strömenden Dampf (eventuell auch mehreremal) sterilisirt und nach dem Abkühlen in feuchten Kammern zum Gebrauche aufbewahrt. Durch ein 12 bis 24 stündiges Verweilen im Brütöfen wird die Probe auf den Erfolg der Sterilisirung gemacht. (Neuerer Zeit kommen zur Conservirung der Nährsubstrate Glasylinder mit Rinnendeckel zur Anwendung. Diese Cylinder werden sammt Inhalt im Dampftopf sterilisirt und nach dem Erkalten die Rinne mit Glycerin ausgegossen.) Auf diese Weise lassen sich Nährsubstrate eine unbegrenzt lange Zeit aufbewahren, ohne dass deren ursprüngliches Wassergehalt eine Abnahme erleiden würde.

Das Impfen der sterilisirten Kartoffelscheiben wird in der bekannten Weise vorgenommen, am vortheilhaftesten von Culturen aus flüssigen Nährmedien. Man belässt die Kartoffelculturen, welche in feuchten Kammern oder den oben erwähnten Rinnencylindern untergebracht wurden, bei dem betreffenden Temperatur-Optimum bis zur gewünschten Entwicklung. Wir haben es nun in unserer Hand, die Mehrzahl der bisher bekannten Mikroorganismen, ohne sie abzutödten, in ein gewisses Latenz-Stadium zu überführen, indem wir unsere Kartoffelculturen in folgender Weise bacteriendicht verschliessen.

Man erwärmt eine kreisrunde Glasscheibe von 7—8^{cm} Durchmesser, indem man sie am Rande mittelst einer Tiegelszange fasst und unter langsamen Bewegungen in kleinem Kreise über der Gasflamme eines Bunsenbrenners auf ca. 100 bis 120° erhitzt. Nun bedeckt man mit derselben rasch die unmittelbar vorher geöffnete Kartoffeldose, reinigt ohne Verzug den Deckel gründlich an der Innenseite, fasst den Rand des letzteren mit der Tiegelszange und erhitzt den Glasdeckel in derselben Art wie die Glasscheibe, nur lässt man ihn noch heisser werden (150 bis 170°) und

die Flamme bloss die Innenseite des Deckels bespülen. Nach einiger Uebung wird diese Procedur gefahrlos gelingen; dem Ungeübten werden anfangs allerdings einige Deckel beim Erhitzen springen. Man setzt den erhitzten Deckel mit der inneren Seite nach unten auf die noch heisse Glasplatte möglichst genau auf den bedeckten Untertheil und lässt soweit abkühlen, dass man den Deckel gerade noch eine kurze Zeit zwischen zwei Fingern zu halten vermag, also bis ca. 70°, taucht nun den Rand des etwas geneigt gehaltenen Deckels in geschmolzenes Paraffin von ungefähr gleicher Temperatur und setzt ihn rasch auf den Untertheil auf, nachdem unmittelbar vorher mit der linken Hand die Glasplatte entfernt wurde, drückt fest an ohne zu drehen, wartet das beginnende Erstarren des Paraffins ab, fasst die Glasdose zwischen Daumen und Zeigefinger der linken Hand und trägt auf die Fuge zwischen Deckel und Untertheil mittelst eines Pinsels noch genügend viel Paraffin auf, um die ganze Fuge verschwinden zu machen. Nach dem Erstarren wird das überflüssige Paraffin mittelst eines Messers, anhaftende Ueberreste durch Reiben mit einem weichen Leinwandlappen entfernt und — handelt es sich um ein Demonstrationsobject, welches einer Sammlung einverleibt werden soll — die nunmehr mit Paraffin ausgefüllte Fuge mittelst Haarpinsels ein- oder zweimal mit einem Weingeistfirniss bestrichen. Wir benutzen hierzu den folgenden:

Aethylalkohol	200
Gumm. laccae albiss	90
Bals. copaiv.	8.

Nimmt man das Eintauchen des Deckels vor, so lange dieser oder das Paraffin noch zu heiss sind, dann überzieht sich rasch ein grosser Theil der Innenseite des ersteren mit einer dünnen Paraffinschicht und man ist genöthigt, den Deckel nochmals zu reinigen, zu erhitzen und einzutauchen. Beim Verkitten der Fuge soll das zwischen Deckel und Untertheil sich befindliche Paraffin nicht bereits erstarrt sein, weil das neu aufgetragene mit dem bereits fest gewordenen sich sonst nicht innig genug verbinden würde und so kein dichter Verschluss zu Stande käme. Wäre es andererseits noch zu dünnflüssig und man wendete zum Verkitten zu heisses Paraffin an, dann überzieht sich vermöge der Capillaritätswirkung wieder die Innenseite des Deckels; es ist dies einer der heikelsten Theile der Arbeit.

Nach der beschriebenen Methode erhält man luft- und pilzdicht verschlossene Kartoffelculturen, welche nach den bisherigen Erfahrungen eine lange, bisher noch nicht endgültig bestimmbare Zeit unverändert aber auch keimfähig erhalten werden können. Nach den durch mehrere Jahre hindurch fortgesetzten Versuchen mit in solcher Weise conservirten Kartoffelculturen waren bei einzelnen Organismen noch nach 2½ Jahren Uebertragungsversuche von Erfolg begleitet.

In den meisten Fällen und wenn es sich nicht um Anaëroben handelt, wird die Weiterentwicklung schon in den ersten Tagen nach erfolgtem Verschlusse verzögert und steht in 5 bis 14 Tagen völlig still. Die heisse Glasplatte, mit welcher die Glasdose vor ihrem Verschlusse bedeckt wird, schädigt das Leben der Reincultur keineswegs; sie hat den Zweck Luftverunreinigungen während der Zeit, welche die Präparation des Deckels in Anspruch nahm, von der Cultur fern zu halten, dann den Dosenrand zu trocknen und zu erwärmen, damit das Paraffin anhafte und schliesslich die Luft im Schälchen zu verdünnen und dadurch späteren durch Temperatursteigerungen hervorgebrachten Spannungen vorzubeugen. Durch die Luftverdünnung wird entsprechend auch der Gehalt an freiem Sauerstoff vermindert, was vielleicht mit zu dem bald eintretenden Stillstand des Wachstums beitragen dürfte.

Der Vorthail der jetzt zur Anwendung kommenden Dosen gegenüber den in der ersten Publication erwähnten und auch gegenüber anderen Gefässen liegt in der so leicht zu erzielenden Verhinderung des Eindringens einer Verunreinigung nach erfolgter Impfung, vorausgesetzt, dass exact gearbeitet wird, da der dichte Verschluss sich stets leicht und bequem herstellen lässt.¹

II. Conservirung von Plattenculturen.

Das Verfahren Platten zu conserviren ist entschieden ein etwas umständlicheres und verlangt viel grössere Sorgfalt. Misserfolge, theils in Folge von Verunreinigung, oder wegen nachträglicher Veränderungen in der Gelatine resp. Agar, ferner in Bezug auf die passende räumliche und quantitative Vertheilung der Colonieen aber auch der Gelatine resp. Agar sind viel häufiger. Dagegen sind auch die Demonstrationseffecte der gelungenen Platten viel bedeutender.

Um Plattenculturen zu conserviren, benutzen wir kreisrunde, flache Glasdosen von 55^{mm} Durchmesser und 12^{mm} Dicke, welche auf beiden Seiten plangeschliffen sind. Der in der gleichen Ebene liegende Hals hat die Form eines cylindrischen Rohres von 12^{mm} äusserem Durchmesser

¹ Für gewisse Zwecke wird auch ein neuer fester Nährboden in Anwendung gebracht, derselbe besteht aus einer Mischung von Reismehl, Bouillon und Milch in ungefähr folgendem Verhältniss: Reismehl 10^g, Milch 15^{ccm}, neutral. Bouillon 5^{ccm}. Diese Materialien werden in der Reibschale innig vermischt und dann in die Glasdosen mittelst Pipetten eingefüllt und wiederholt (fractionirt) sterilisirt. Hierbei gerinnt der Brei zu einer homogenen, mit schön weisser, glatter Oberfläche versehenen Masse, die auch vollständig an den Wänden fest haftet und manchen Organismen, die auf Kartoffeln nicht oder nur kümmerlich wachsen, einen üppigeren Nährboden gewährt, aber auch manche charakteristische Wachsthumerscheinungen darbietet.

und besitzt in der Nähe der Dosenperipherie eine Einkerbung, welche das Lumen des Rohres etwa zur Hälfte verengt. Es sind ähnliche Fläschchen auch von Anderen (Rozsahegyi, Lipez, Wilfarth) beschrieben worden.

Die Hälse werden mit Wattepfropfen versehen, die Dosen erst trocken bei 150° sterilisirt, sodann mit Nährgelatine oder Nähragar mittelst Pipette bis zu etwa $\frac{1}{4}$ der Dosenhöhe gefüllt und in Drahtkörben oder in Rinnencylindern im strömenden Dampf wiederholt sterilisirt. Hierbei hat man darauf zu achten, dass alle Dosenhälse nach aufwärts gerichtet bleiben, damit weder Hals noch Wattepfropf mit Nährsubstrat benetzt werden. Behufs der Impfung werden die Dosen im Wasserbad auf 42° abgekühlt. Inzwischen werden ca. 6 bis 7 Verdünnungen der betreffenden Reincultur bereitet, indem auf sterilisierter und mit Glocke bedeckter Glasplatte mittelst sterilisierter Capillar-Pipetten sechs entsprechend von einander getrennte Tropfen Bouillon oder sterilisiertes Wasser geträufelt werden. In den ersten Tropfen wird mittelst einer Platinöse eine Spur der Reincultur übertragen, von dem ersten Tropfen mit neuerdings sterilisierter Nadel eine Spur in den zweiten Tropfen und so weiter bis zum letzten Tropfen. Mit kleinster Oese an langer Nadel impfen wir hierauf aus der fünften und sechsten, event. auch aus der vierten Verdünnung den Inhalt von zwei bezw. drei Plattendosen, mischen energisch durch, schütteln und lassen auf der Niveauglasplatte erstarren. Die Erkerbung im Halse kömmt nach abwärts zu stehen und verhindert das Rückströmen des noch nicht erstarrten Nährsubstrats in den Dosenhals, dient auch später beim Abimpfen als Führung für die Platinnadel. Die Gelatine-Dosenplattenculturen kann man mit den Hälsen bezw. Wattepfropfen nach unten in den gewöhnlichen Reagensglasgestellen bis zur gewünschten Entwicklung sich selbst überlassen. Will man jedoch dem Nährsubstrat seinen ursprünglichen Wassergehalt unvermindert erhalten, dann ist die Aufbewahrung der Plattenculturen in feuchten Kammern oder Rinnencylindern mit Glycerin- oder Sublimatabschluss vorzuziehen. Die Agar-Dosenplattenculturen müssen oft zunächst liegend übereinandergeschichtet in trockenen Kammern aufbewahrt werden, da der Nähragar unmittelbar nach dem Erstarren oft nur lose an den Glaswänden haftet. Erst wenn das ausgepresste und Condensationswasser zum Theil verdampft ist, darf man die Plattendosen vertical aufstellen, ohne ein Abgleiten des Agars befürchten zu müssen.

Hat die Vegetation jenen Grad erreicht, welcher uns die Conservirung der Platte erwünscht scheinen lässt, so wird die Cultur durch mehrmaliges Eintauchen des Dosenhalses in geschmolzenes Paraffin von ca. 100° verschlossen. Man führt den Dosenhals bis etwa zur Hälfte des Wattepfropfens in die heisse Flüssigkeit, lässt erstarren, taucht nochmals ein, schneidet nach neuerlichem Erkalten den prominirenden Theil des Pfropfens

mit einem scharfen Messer in gleicher Ebene mit dem Glasrande ab, taucht nochmals ein und entfernt schliesslich das am äusseren Dosenhalse haftende Paraffin mittelst Messer und Leinwandlappen.

Hat man bei diesen Dauer-Plattenculturen die richtige Verdünnung eingehalten, so dass nur wenige Colonieen, 5 bis 10 oder 20 heranwachsen, so gewährt eine solche Dose ein Bild, das zu dem Schönsten gehört, was die Plattenmethode zu leisten vermag. Bei einer derartigen Verdünnung kommt der Entwicklung der Colonie der Umstand zu Gute, dass dieselbe ihre ganze Wachstumsenergie entfalten kann, indem sie weder im Raume noch in der Zeit beschränkt ist, und wenn der Paraffinverschluss nicht zu früh angelegt, der Luftabschluss nicht zu früh vorgenommen wird, so erhält man Präparate, die wahrhaft überraschend wirken. Zu ganz besonderer Schönheit und Grösse entwickeln sich, um einige Beispiele anzuführen, so isolirte Colonieen von Typhus, von Mäusesep ticämie, von Pneumonie (Friedländer), von Milzbrand (in Agar) etc. und liegt der Schwerpunkt eben darin, die richtige Verdünnung zu finden, dass eben nur wenig Colonieen zur Entwicklung gelangen, dass keine Behinderung des Wachstums durch Concurrenz eintritt. Die Dauer-Plattenculturen können mit schwachen Vergrösserungen mikroskopisch untersucht werden. Man kann sie dem Anfänger zum Studium unbedenklich überlassen, ohne das übliche Verunreinigtwerden der Plattencultur oder eine Infection befürchten zu müssen. Die Erfahrungen über diese Art der Dauerculturen reichen zurück bis zum Juni des Jahres 1887; nach einem gewissen Maximum in der Entwicklung tritt ein Stillstand ein und die Präparate halten sich unverändert. Im Allgemeinen sei hervorgehoben, dass von sämtlichen 80 Kartoffel- resp. Gelatineculturen die auf dem hygienischen Congresse demonstrirt wurden, im Ganzen ca. 12 Kartoffelculturen und Plattenculturen nachträglich dem Verderben anheimfielen (durch Verschimmeln oder Austrocknen — wegen mangelhaften Verschlusses). Selbst der zweimalige Eisenbahntransport zwischen Prag und Wien, der ohne besondere Cautelen vorgenommen wurde, hat bei diesem ersten Versuch zu keiner Beschädigung geführt.

Noch wollen wir die Wahl unseres Verschlussmittels, des Paraffins, rechtfertigen. Das Paraffin bietet gegenüber den zahlreichen von uns geprüften Verschlussmitteln die meisten Vor- und die wenigsten Nachtheile. Sein niederer Schmelzpunkt, sein Widerstand gegen weitgehende Temperaturschwankungen zufolge seines geringen Wärmeleitungsvermögens, die leicht zu erreichende Sterilität desselben und insbesondere der Umstand, dass man zum Zwecke des Abimpfens oder des Vernichtens (in Folge nachträglich sich entwickelnder Verunreinigung) das Oeffnen und Wiederverschliessen bez. Reinigen sehr rasch vornehmen kann — diese Eigenschaften finden sich bei keinem der Schlussmittel vereint.

Die Vortheile, die diesen Conservierungsmethoden anhaften sind sehr mannigfaltig. Vor Allem ist man in der Lage, sich eine mehr oder weniger vollständige Sammlung bacteriologischer Dauerpräparate anzulegen. Und der grosse Werth, den dies für Unterrichtszwecke besitzt, in solchen Fällen, wo Hülfskräfte fehlen, um stets frische Culturen zu beschaffen, dürfte wohl unbestritten zugegeben werden; gerade dieser Umstand hat dem einen von uns (S.) die Anregung zu diesem Verfahren gegeben. Sodann aber ist man in der Lage, sich für lange Zeit ein reines Impfmateriel zu erhalten, wenn auch heute noch nicht entschieden werden kann, wie lange sich dieses Material erhält. Aber gerade dieser Gesichtspunkt führt zu dem weiteren Vortheil dieser Methode, dass sie es ermöglicht, zu entscheiden, wie lange das latente Leben der so eingeschlossenen Organismen dauert. Endlich kommt hinzu, dass man auf diese Weise eine unbeschränkte lange Beobachtung der Wachsthumsvorgänge einleite. Die Versuche Esmarch's mit seinen so lange controlirbaren Rollplatten, haben schon in der Desinfectionsfrage¹ die Vortheile, ja die Unerlässlichkeit einer längeren Beobachtung documentirt; man bekommt erst auf diesem Wege ein sicheres Urtheil über die Schwankungen in der Wachsthumsenergie niederer Organismen, über die überhaupt erreichbare Mächtigkeit des Gruppenwachstums der Colonieen, die, um ein Beispiel anzuführen, z. B. bei Mäusesepticämie (in Gelatine) bei Milzbrand in Agar ungeahnte Grössen erreichen. (Es existirt in unserer Sammlung eine, offenbar nur aus einem Keime hervorgegangene Milzbrandecultur in Agar von ca. 17^{mm} Durchmesser.

An der Hand der hier beschriebenen Methoden muss es nun mit Leichtigkeit gelingen,² sich binnen kurzer Zeit eine Art bacteriologischen Museums herzustellen, wie ein solches auch bereits in dem, im Titel genannten Institute bereits im Entstehen begriffen ist. Seine Berechtigung dürfte wohl ebenso wenig geleugnet werden als die der anatomischen und pathologisch-anatomischen und muss einem solchen bei dem gegenwärtigen Standpunkte der Bacteriologie, wo der Schwerpunkt der Differenzialdiagnose der Mikroorganismen in der Beobachtung des Gruppenwachstums mit blossem Auge oder schwachen Vergrösserungen gelegen ist, eine hohe didactische Bedeutung zugesprochen werden.³

¹ Esmarch, Der Henneberg'sche Desinfector. *Diese Zeitschrift*. Bd. II.

² Vgl. auch J. Eisenberg, Bemerkungen über Kartoffeldauerculturen nach der Methode des Prof. J. Soyka. *Centralblatt für Bacteriologie*. 1885. Bd. III. S. 216.

³ Alle hier beschriebenen Glasgeräthe und Utensilien sind nach unseren Angaben verfertigt worden und vorrätzig bei der Firma Franz Botka, Handlung chemischer und physikalischer Apparate in Prag, I. Bergstein 10.