Ueber Geisselfärbung bei Bakterien.

Von

Prof. Dr. **Zettnow**
in Berlin.

Seitdem Löffler¹ seine bahnbrechenden Arbeiten über die Färbung der Geisseln bei Bakterien veröffentlicht hat, sind an seinem Verfahren, das nicht in Jedermanns Händen gute Resultate liefert, nur unwesentliche Abänderungen vorgenommen worden; statt gestandener, oxydirter Beize, wie sie Löffler bereits verwendet hat, wurden Eisenoxydsalze mit dem Tannin gemischt, ohne dass in der Mehrzahl der Fälle der Erfolg in den Händen Anderer als derjenigen der Autoren ein wesentlich besserer geworden wäre. Ich habe mich bis in die neueste Zeit hin des von Löffler angegebenen Gemisches bedient, ihm jedoch 3 Proc. Phenol zugesetzt; es hierauf in einer flachen Schale der Luft ausgesetzt, bis ein geringer Niederschlag entstanden war und mit dieser Flüssigkeit, in welcher auch nach dem Filtriren neben gerbsaurem Eisenoxydul sich gerbsaures Eisenoxydsalz in Schwebefällung befindet, gute Resultate erhalten. Ich bin der Meinung, dass beim Beizen zuerst das Tannin sich mit den Bestandtheilen der Geissel verbindet und dass hierauf das an ihm sich niederschlagende gerbsaure Eisenoxyd die Beizung vollendet und ihr Kraft verleiht. Dass diese Vorstellung den wirklichen Vorgängen entspricht, davon kann man sich leicht auf folgende Weise überzeugen: Angenommen man beizt ein Präparat von *Proteus vulgaris* nur mit Tannin, so wird man selbst nach heisser und lange Zeit dauernder Behandlung die Geisseln nur schwach sichtbar werden sehen; benutzt man hierauf zwei Präparate von derselben Ausstrichflüssigkeit und beizt sie mit obiger Mischung kalt

¹ Löffler, Eine neue Methode u. s. w. *Centralblatt für Bakteriologie*. 1889. Bd. VI. S. 209. — 1890. Bd. VII. S. 625.

so lange, bis man bei dem einen die Geisseln deutlich erkennt, so wird das zweite, falls man es vor dem Abspülen der Beize kurze Zeit erhitzt und auf diese Weise das niedergeschlagene gerbsaure Eisenoxyd in dem überschüssigen Tannin löst, die Geisseln bedeutend schlechter, vielleicht gar nicht erkennen lassen, da nun fast nur die Wirkung des Tannin allein zur Geltung kommt. Den Punkt, wo eine genügende Menge fester Stoffe sich bereits an den Geisseln abgesetzt hat und noch nicht auf der Glasoberfläche, ist schwierig, fast unmöglich zu treffen, da sowohl beim kalten, wie heissen Beizen das Absetzen der Oxydationsproducte an den Rändern des Deckglases zuerst beginnt; daher fallen die Präparate stets ungleichmässig aus; oft zeigt nur ein kleiner Bezirk sich als gut. Wie dick in manchen Fällen die Geisseln sich unbeabsichtigt auf solche Weise „anfärben“ lassen, davon hat wohl schon Jeder, der sich mit diesem Zweige der Färbetechnik beschäftigt hat, Beispiele gesehen. Schade nur, dass man dieses Verhalten nicht beherrscht, um es nach Belieben benutzen zu können.

Bowhill's¹ Verfahren hat mir nur ungenügende Resultate gegeben; sowohl bei Benutzung von selbsthergestellter Orceinlösung, sowie solcher von der Geschäftsstelle Carl Zeiss erhaltenen, färbten sich die Geisseln sehr schwach, meist gar nicht. Da der Verfasser in seiner Abhandlung sagt, dass die Geisseln besser in Wasser, als in Canadabalsam zu sehen seien, so schliesse ich daraus, dass sie auch in seinen Präparaten schlecht sichtbar, also wenig kräftig gefärbt waren.

Einen ganz anderen Weg zur Darstellung der Geisseln hat van Ermengem² 1893 eingeschlagen: Er beizt mit einer Mischung von Tannin und Osmiumsäure, schlägt hierauf, ähnlich wie Golgi, metallisches Silber in ihnen nieder, indem er das Präparat zuerst in eine verdünnte Lösung von Silbernitrat, dann in eine Reduktionsflüssigkeit taucht, hierauf wieder in die Silberlösung, zum zweiten Male in die Reduktionsflüssigkeit und dies Verfahren so oft wiederholt, bis die Silberlösung, da das Präparat niemals mit Wasser gespült wird, sich dunkel färbt. Wer die chemischen Vorgänge bei photographischen Processen versteht, wird erkennen, dass sein Verfahren etwas roh ist; es bleibt daher auch der bei diesen Arbeiten so gefürchtete Schleier nicht aus: Das Präparat ist stets mit groben Silberkörnern übersät und wenig schön; auch arbeitet das Verfahren selbst bei Bakterien mit kräftigen Geisseln nicht sicher; ich habe es daher nach wiederholten Versuchen ganz aufgegeben.

¹ Bowhill, *Hygienische Rundschau*. 1898. Nr. 3.

² van Ermengem, *Nouvelle Methode de Coloration des Cils. Travaux du Laboratoire d'Hygiene et de Bacteriologie de l'Université de Gand*. T. I. Fasc. 3.

Eine ähnliche Methode wie van Ermengem, jedoch unter Verwendung anderer Silberverbindungen, benutzt Hr. Dr. Welcke, wie er mir Ende April 1898 unaufgefordert brieflich mittheilte. Da seine Präparate die feineren Geisseln nur schwach gelb gefärbt zeigten und meinen, nach Löffler's Angaben hergestellten, bedeutend nachstanden, versuchte ich sein Verfahren nicht; erst Mitte Juni, als mir der Gedanke kam, dass auf der Gegenwart von Silber in den wenn auch nur schwach gefärbten Geisseln sich die heut zu Tage üblichen photographischen Methoden der Verstärkung und Umwandlung des Silbers in Gold vielleicht anwenden liessen, stellte ich einige Versuche an und gelangte in etwa 8 Tagen dahin, die einzelnen Geisseln bei Spirillen, *Proteus vulgaris*, Typhus und Cholera tief blauschwarz zu färben; ich hatte mich dabei der oben angegebenen bewährten Beize bedient, auch eine andere Silberlösung wie Hr. Dr. Welcke benutzt, so dass die Reaction eine empfindlichere wurde. Dieser Theil meiner Arbeit war daher schon zu jener Zeit zur Veröffentlichung bereit; ich wollte jedoch Hrn. Dr. Welcke, dem ich meine Ergebnisse mitgetheilt hatte, den Vorrang in der Publication lassen, da er nach Ansicht meiner Präparate und in Kenntniss, dass ich photographische Methoden benutze, sich entschlossen hatte, sein Verfahren zu verbessern und dies Ziel auch Ende September 1898, soviel ich weiss, erreicht hat; andererseits befriedigten mich meine Resultate noch nicht, da die Färbung der Geisseln bei jenen grossen, sich langsam bewegenden Bacillen wie *Astasia*, *Bac. subtilis*, *oxalaticus* und anderen unsicher war, meist ganz ausblieb. Ich habe meine Versuche daher nach halbjähriger Pause Ende December 1898 wieder aufgenommen und war zunächst bestrebt, die Beize so zu verbessern, dass sie keine Niederschläge giebt; dies ist mir dadurch gelungen, dass ich den Factor, der dieselben bewirkt, fortschaffte: nämlich das Eisenoxydulsalz, welches durch seine Umwandlung in schwer lösliches, gerbsaures Oxydsalz Veranlassung zu ihnen giebt.

Die Eisenoxydbeize

wird in folgender Art bereitet: 20^{grm} Tannin, *Acidum tannicum levissimum*, übergiesst man in einer Porzellanschale oder einem emaillirten Topf mit 300^{ccm} Wasser, erhitzt die Flüssigkeit zum Kochen und trägt allmählich so viel mit Wasser zu Brei angerührtes Eisenhydroxyd, *Ferum oxydatum fuscum* ein, bis ein geringer Ueberschuss auch nach 5 Minuten langem Kochen vorhanden ist. Während die ersten Antheile des Oxydes sich leicht lösen, indem die Flüssigkeit sich tief blauschwarz färbt, sieht man zuletzt beim Neigen der Schale ungelöste Theile am Boden. Da das käufliche *Ferum oxydatum fuscum*, selbst das als purissi-

mum bezeichnete, wegen ungenügender Auswaschung basische Salze enthält, thut man gut, es zuerst mit ammoniakhaltigem Wasser auszukochen und gut auszuwaschen; ich habe mir aus Eisenchlorid durch Fällen mit Ammoniak reines Eisenhydroxyd zu meinen Versuchen dargestellt.

Nach dem Filtriren ist die erkaltete Beize zur Benutzung fertig; sie setzt niemals Niederschläge auf dem Präparate ab, arbeitet sehr klar, färbt die kräftigen Geisseln bei grossen Spirillen, *Proteus vulgaris*, *Sarcina agilis* vorzüglich, fängt an bei Cholera und Typhus Schwierigkeiten zu bereiten und versagt bei vielen Bakterien.

Ihr überlegen sind die folgenden beiden neuen Beizen:

A. Die Thonerdebeize.

Man stellt sie dar, indem man 10^{grm} Tannin in einem Glaskolben mit 200^{ccm} heissem Wasser übergiesst, den Kolben dann in einen Topf mit Wasser von 55 bis 60° setzt und hierauf unter Beibehaltung dieser Temperatur allmählich mit Liquor aluminii acetici versetzt, bis der entstandene Niederschlag von gerbsaurer Thonerde sich beim Umschütteln der Flüssigkeit nicht mehr löst, sondern auch noch nach 5 Minuten ungelöst umherschwimmt; hierauf filtrirt man. Statt der concentrirten Lösung des käuflichen Liquor aluminii acetici benutzt man besser eine mit Wasser auf das 5fache verdünnte. Die fertige Beize ist haltbar; sie soll erkaltet klar bleiben, auch nach einigen Tagen sich nicht trüben, höchstens opalisiren; wird sie undurchsichtig, so erwärmt man sie gelinde und setzt ein wenig Tanninlösung hinzu. Sie wirkt bedeutend kräftiger als die Eisenbeize, so dass man mit ihrer Hülfe leicht die Geisseln von Cholera, Typhus, *Bacillus subtilis* sichtbar machen kann; sie setzt jedoch bei hoher Temperatur und verlängerter Dauer der Beizung leichter einen Niederschlag ab, als jene, da die Essigsäure, welche das in Tannin schwer lösliche gerbsaure Aluminiumoxyd zum grössten Theil in Auflösung hält, in der Hitze anfängt zu entweichen.

B. Die Antimonbeize

wirkt viel kräftiger als die vorige und stellt, da sie Niederschläge nicht liefert und allen Bakterien gegenüber sich als wirksam erweist, eine Universalbeize vor.

Man bereitet sie, indem man in einem Glaskolben 5^{grm} Tannin in 100^{ccm} Wasser löst und den Kolben in Wasser von 35 bis 40° einstellt; hierauf erhitzt man etwa 1^{grm} Brechweinstein, Tartarus stibiatus, in einem Reagirglase mit Wasser bis zur Lösung und setzt diese solange zur Tanninlösung, bis der Niederschlag von gerbsaurem Antimonoxyd, welcher

sich zuerst beim Umschütteln auflöst, dauernd bleibt. Die nach dem Filtriren fertige Beize soll erkaltet stark opalisiren, im durchfallenden Lichte jedoch noch durchscheinend sein, nicht undurchsichtig trübe; bei mässigem Erwärmen soll sie vollkommen klar werden; ist der Niederschlag zu stark in der kalten Beize, so setzt man etwas Tanninlösung zu und erwärmt; sie ist haltbar und wirkt auf grosse Spirillen, *Proteus vulgaris* so kräftig, dass die Geisseln fast schon zu dick erscheinen; dicht liegende zu verschmelzen anfangen; sie arbeitet vollkommen klar und wirkt ausgezeichnet bei den Bakterien mit schwer darstellbaren Geisseln. Ihre Wirksamkeit kann auf doppelte Weise gesteigert werden: 1. dadurch, dass man das Präparat in der heissen Beize erkalten lässt, bis diese eben anfängt, sich zu trüben, wobei gerbsaures Antimonoxyd sich auf den Geisseln niederschlägt; 2. indem man ihre saure Reaction abstumpft; während Eisenoxyd- und Thonerdebeizen, einen Zusatz von Alkali nicht vertragen, ohne sich beim Erwärmen stark zu trüben, kann man die Antimonbeize, welche überhaupt nicht stark sauer reagirt, mit soviel Natronlauge versetzen, dass sie amphoter oder auch schwach alkalisch auf Lackmus reagirt; nur völlig neutral darf sie nicht gemacht werden, da sich alsdann oft plötzlich ein dicker Niederschlag bildet. Bei der Nachweisung sehr feiner Geisseln ist eine amphoter reagirende Beize mit Vortheil zu verwenden und muss jedes Mal frisch dargestellt werden, da sie sich nur einige Stunden hält.

Zur Anfertigung eines Geisselpräparates verfare ich in folgender Weise:

I. Herstellung des Ausstriches.

Um die Bakterien in möglichst reinem Zustande auf die Deckgläser zu bringen und sie nach Möglichkeit von fremden oder durch Wasser aus ihnen zu entfernenden Stoffe zu befreien, habe ich sie 3 bis 4 Mal mit Wasser gewaschen; benutzt man die übliche Methode, nach welcher man ein wenig einer Agarcultur in Wasser vertheilt und dann ausstreicht, so wird man selten Präparate erhalten, welche die Bakterien auf klarem Grunde zeigen; Schleier und Schmutzzonen, sowie scheinbare Kapseln um die Bakterien, von denen die Geisseln ausgehen, werden überall auftreten. Will man Musterpräparate herstellen, in denen fast alle Bakterien Geisseln zeigen, so muss man schon bei der Wahl des Nährbodens Vorsicht walten lassen, um der betreffenden Art die günstigsten Bedingungen für ihren Lebensprocess zu schaffen.

Ich habe daher die aëroben Arten auf der Oberfläche einer nicht sehr steifen Agarplatte oder in dünner Schicht von Bouillon, den Boden

eines Kolbens bedeckend, gezogen; die anaëroben stets in letzterer. Zur Aussaat habe ich Material aus frischer Cultur benutzt und die junge, meist 10 bis 20 Stunden alte Cultur bei Bouillon, sobald sie sich kräftig getrübt hatte, abgetödtet, indem die Bakterien von der Platte mit Wasser abgespritzt und die trübe Flüssigkeit mit Formalin versetzt wurde. Vorher hatte die mikroskopische Beobachtung gezeigt, dass die Bakterien gut beweglich waren. Bouilloneulturen wurden vorsichtig von einem etwaigen Bodensatz ab und in einige Cubikcentimeter 4proc. Formalins gegossen. Dieses ziehe ich der Osmiumsäure und dem Sublimat vor, da nach Versuchen mit *Spirillum volutans* und *Proteus vulgaris*, den beiden Bakterien, welche mir bei allen meinen vergleichenden Experimenten als Versuchsobjecte dienten, Sublimat ein wenig, Osmiumsäure deutlich schädigenden Einfluss auf die Färbung der Geisseln ausübten, während bei Formalin ein solcher gegenüber lebend eingetrockneten Bakterien nicht zu beobachten war. Bringt man die Flüssigkeit mit den abgetödteten Bakterien in ein Spitzglas, so setzt sich die Hauptmasse der letzteren in 24 bis 72 Stunden ab; die grossen Arten, wie Spirillen, Heubacillen, oft schon über Nacht; bei den kleineren oder an Geisseln sehr reichen Arten, welche sich schwer absetzen, kann man durch Abgiessen der trüben Flüssigkeit nach 24 Stunden und Stehenlassen derselben eine Art Trennung der grösseren Fäden von den kleinen Individuen erzielen. Den Absatz in der Spitze des Glases schwemmt man hierauf mit Formalinwasser, d. h. Wasser mit 1 procent. Formalin versetzt, auf, und wiederholt das Verfahren noch 2 Mal. In dem Wasser geht das Absetzen schneller vor sich, als in der ursprünglichen Flüssigkeit; das letzte Mal benutzt man reines steriles Wasser, da Flüssigkeiten, welche Formalin enthalten, auch auf völlig reinen, durch Erhitzen von allem Fett befreiten Deckgläsern, nach dem Ausstreichen gern sich wieder zu einem Tröpfchen zusammenziehen. Es empfiehlt sich, eine Anzahl Deckgläser im Vorrath zu streichen und durch mässige Hitze fixirt aufzubewahren. Die nicht benutzte Bakterienmasse lässt sich in kleinen Fläschchen in 1 procent. Formalinwasser lange Zeit aufbewahren. Das Ausschleudern der Bakterien führt schneller zum Ziel, als das Absetzenlassen derselben; empfiehlt sich jedoch nur für Arten mit wenig Geisseln, wie z. B. die Vibrionen; an Bewegungsorganen reiche, d. h. fast alle Sorten mit seitenständigen Geisseln büssen die Hauptmasse derselben ein.

II. Die Beizung.

Das Präparat wird mit Wasser abgespült, dann die bestrichene Seite nach unten gekehrt in ein Blockschälchen gelegt, mit der eventuell durch Erhitzen im Reagensglase geklärten Beize übergossen und für 5 bis 10 Mi-

nuten auf eine 70 bis 80° heisse Platte gesetzt, nachdem das Schälchen bedeckt ist. Bei dieser Behandlungsart setzen sich nicht wie bei dem Erwärmen über einer kleinen Flamme an den Rändern feste Stoffe ab, die man meist nur mit Mühe entfernen kann; das Präparat lässt sich nach dem Herausnehmen mit der Pincette, darauf Fassen mit zwei Fingern der linken Hand leicht und völlig durch einen Wasserstrahl von der Beize befreien; man lasse derjenigen Ecke, an welcher man es später mit der Zange hält, besondere Sorgfalt angedeihen und spüle es nach dem Fassen mit ihr noch einmal gut ab. Ich habe stets das Berliner Leitungswasser benutzt und bei den folgenden Operationen mit Gold- und Silbersalzen auch nicht bemerkt, dass das Metall der Zange, Eisen oder Messing, von störendem Einfluss bei diesen Salzen war; nur unmittelbar an der Berührungsstelle bildet sich auf dem Glase ein kleiner schwarzer Fleck. Als Platte beim Erhitzen der Blockschälchen benutze ich eine dicke, gusseiserne, etwa 25 cm im Quadrat (bei jedem Eisenhändler für 1 bis 1.5 Mk. zu erhalten) und heize sie durch einen Brenner mit Kronenaufsatz, der ausserhalb der Mitte steht; man findet dann leicht die passend heisse Stelle und kann mehrere Schälchen zu gleicher Zeit erwärmen; sie können so heiss werden, dass man sie mit den blossen Fingern gerade nur noch von der Platte herunternehmen kann. In einer kräftigen Beizung liegt der Schwerpunkt für die folgenden Operationen.

Die grosse Reductionsfähigkeit von Gold- und Silbersalzen durch Tannin, eventuell gerbsaure Verbindungen, erlaubt, die gebeizten Geisseln auf doppelte Weise sichtbar zu machen — indem man in ihnen entweder zuerst Gold niederschlägt, siehe Nr. III oder Silber Nr. IV.

III. Die Goldmethode.

a) Niederschlagung des Goldes.

Bringt man auf das gebeizte Präparat 4 bis 5 Tropfen einer Lösung von Aurum chloratum neutrale 1:2000 und erwärmt die Flüssigkeit bis zur kräftigen Dampfbildung, so schlägt sich in den Leibern der Bakterien, sowie in ihren Geisseln metallisches Gold mit blauschwarzer Farbe nieder. War die Beizung eine gute, so wird man nach dem Abspülen der Goldlösung beim Betrachten des Präparates mit einem mittelstarken Trockensystem, z. B. dem Apochromaten 8^{mm} foc. Oc. 8 oder Leitz Nr. 7 Oc. 3 die Geisseln deutlich wahrnehmen können; sind sie nicht sichtbar oder erst mit Oel-Immersion erkennbar, so war die Beizung eine zu schwache; dasselbe Präparat noch einmal mit der Beize zu behandeln, bringt selten Vortheil, man benutze ein neues. Ehe man die Geisseln nicht mit einem Trockensystem, wenn auch nur schwach erkennen kann, ist es nicht rathsam, die weiteren Verstärkungen vorzunehmen.

b) Verstärkung durch Pyrogallol und Silberlösung.

Bei der geringen Reactionsfähigkeit von metallischem Gold kann man mit ihm keine chemischen Umsetzungen vornehmen, ohne zugleich die Bakterien zu schädigen; dagegen gelingt es leicht, Silber auf ihm niederzuschlagen, da letzteres aus einer Lösung sich abscheidend in statu nascendi eine grosse Neigung besitzt, sich an anderen Metallen abzusetzen. Ich habe mich für diesen Zweck des beim nassen Collodiumprocess üblichen Verstärkungsverfahrens bedient und nur die Reductionsflüssigkeit saurer gemacht, damit die Abscheidung des Silbers ganz langsam vor sich geht. Man braucht 1. eine Lösung von 2^{grm} Citronensäure in 150^{ccm} Wasser, zu der man 0.5 Pyrogallol setzt und zur Verhütung von Schimmelbildung ein Stückchen Thymol; 2. eine Lösung von Argentum nitricum 1:100. Beide Lösungen sind haltbar, die erstere auch noch brauchbar, wenn sie sich gelb gefärbt hat. Man bringt nun auf das gut abgespülte Deckglas 4 Tropfen Pyrogallol- und 1 Tropfen Silberlösung, mischt durch Bewegen des Präparates und lässt die Flüssigkeit 1 Minute auf dem Deckglase; spült ab und wiederholt das Verfahren. Bei Controle durch das Mikroskop wird man sich leicht davon überzeugen, dass die Geisseln an Kraft zugenommen haben. Eine öftere als zweimalige Wiederholung des Verfahrens empfiehlt sich nicht, ebensowenig eine längere Einwirkung des Gemisches als 1 Minute, da sich sonst leicht das sich abscheidende Silber an anderen Stellen als nur an den Bakterien ansetzt und die geringe Menge des abgeschiedenen Silbers für weitere Verstärkungen nach anderen Verfahren genügt; solche sind bei der Silbermethode Nr. IV unter b und c angegeben.

IV. Die Silbermethode.

Die schwachen Seiten des vorigen Verfahrens, bei welchem zuerst Gold niedergeschlagen wird, bestehen darin, dass sich aus der unter III b angegebenen Mischung leicht Silberkörnchen, wenn auch nicht am Glase, so doch zwischen den Geisseln absetzen; diese verunzieren das Präparat und nur bei genauer Befolgung der obigen Vorschrift erhält man gute Resultate. Die Methode, zuerst Silber in den Geisseln niederzuschlagen, ist frei von diesem Uebelstande und ihr daher vorzuziehen; dazu kommt der Vortheil, dass durch die gleiche Menge Tannin mehr Silber als Gold, dem Gewichte nach im Verhältniss von $324:196 = 1:0.6$ Theilen, niedergeschlagen wird, unter der Voraussetzung, dass bei den Metalllösungen die gleichen Oxydationsproducte entstehen; eine Annahme, welche mir dadurch wahrscheinlich gemacht wird, weil bei möglichst gleicher Beizung zweier Präparate die Geisseln nach Einwirkung von Silberlösung kräftiger erscheinen als nach derjenigen von Chlorgold.

a) Niederschlagung des Silbers.

Ich habe eine ganze Reihe von Silberlösungen durchprobirt, hauptsächlich die für Glas- und sonstige Versilberungen benutzten und bin schliesslich bei einer Flüssigkeit von folgender Zusammensetzung stehen geblieben, da sie am empfindlichsten ist und die besten Resultate liefert: Es ist eine Auflösung von Silbersulfat in Aethylamin; trotz des hohen Preises des letzteren ($10^{\text{grm}} = 1.5$ bis 2 Mk.) stellt sich der Preis dieser Reductionsflüssigkeit nicht hoch, da 10^{grm} Aethylamin zur Darstellung von 1.5 Liter genügen, einer Menge, welche für 2500 bis 3000 Präparate ausreicht. Da Silbernitrat das gebräuchliche Silbersalz ist, so stellt man sich aus ihm das Sulfat mit Leichtigkeit dar, indem man 5^{grm} Argentum nitricum in 30^{ccm} Aqua destillata auflöst und zu dieser kalten und klaren Lösung eine ebensolche von 5^{grm} Magnesia sulfurica cryst.-Bittersalz oder von 6^{grm} Glaubersalz = Natrium sulfuricum cryst. hinzusetzt. Dem sich bildenden und als schweres krystallinisches Pulver ausfallenden Silbersulfat lässt man $\frac{1}{2}$ Stunde Zeit, sich abzuscheiden; giesst hierauf die überstehende Flüssigkeit ab, ersetzt sie durch 20^{ccm} destillirtes Wasser, rührt um, lässt 1 bis 2 Minuten absetzen; giesst die Flüssigkeit von Neuem ab und wäscht auf diese Weise den Niederschlag noch 2 Mal mit je 20^{ccm} Wasser aus; dann spült man das etwa 4^{grm} wiegende Silbersulfat in eine saubere Flasche, übergiesst es mit 500^{ccm} Wasser und erhält bei öfterem Schütteln nach 1 Stunde eine gesättigte Lösung, während ein Theil des Salzes, welches etwa 160 Theile Wasser von Zimmertemperatur zur Lösung braucht, auf dem Boden ungelöst zurückbleibt. Von dieser Lösung giesst man eine beliebige Menge aus der Vorrathsflasche ab, fügt zu ihr das gleiche Volumen Wasser und versetzt sie solange mit der im Handel zu erhaltenden 30 procent. wässerigen Lösung des Aethylamins, bis der zuerst entstehende braunschware Niederschlag von Silberoxyd sich wieder gelöst hat und die Flüssigkeit vollkommen klar geworden ist; hierauf fügt man vorsichtig und tropfenweise von Neuem Silbersulfat aus der Vorrathsflasche hinzu; in den oberen Schichten der Flüssigkeit bildet sich dann wieder ein Niederschlag von Silberoxyd, der sich zuerst leicht beim Umschwenken der Flüssigkeit löst, dann schwerer. Man hält nun mit dem Zusatz des Silbersulfates inne, ehe der Niederschlag bleibend wird; hat man den Zusatz des Silbersulfates überstürzt, so kann man den Fehler durch Hinzufügung von 0.5 bis 1 Tropfen Aethylamin wieder gut machen und von Neuem mit dem Zusatz des Silbersulfates beginnen. Es kommt darauf an, eine Lösung von Silberoxyd in Aethylamin zu erhalten, welche keinen dieser Stoffe in erheblichem Ueberschuss enthält; die Lösung soll vollkommen klar und farblos aussehen; ist sie gelblich gefärbt,

so ist Silberoxyd im Ueberschuss und setzt sich beim späteren Erhitzen in kleinen braunschwarzen Krystallen als Niederschlag ab; die Menge des überschüssigen Aethylamins soll möglichst gering sein, da sonst die Reaction an Empfindlichkeit einbüsst. Die Lösung des Aethylamin-Silberoxydes ist haltbar und wirksamer als die auf gleiche Weise mit Methylamin erzielte. Bringt man von ihr 4 bis 5 Tropfen auf das gebeizte Präparat und erwärmt zuletzt bis zu kräftiger Dampfbildung, so schlägt sich metallisches Silber von braunschwarzer Farbe wegen seines Gehaltes an anorganischen Stoffen in den Bakterien nieder und kann, nachdem man sich durch das Mikroskop überzeugt hat, welche Kraft die Geisseln besitzen, auf verschiedene Weise weiter verstärkt werden; zeigen die Geisseln nur ein hell- oder dunkelgelbes Aussehen, vielleicht sogar selbst die Leiber der Bacillen ein solches, so hat man nicht stark genug erhitzt und kann mit neuer Flüssigkeit das Verfahren wiederholen; hat sich ein Niederschlag gebildet, so ist meist die Erhitzung zu stark gewesen und das Präparat verloren.

b) Verstärkung mit Goldchlorid.

Mit Leichtigkeit schlägt das in den Geisseln abgelagerte Silber Gold nieder, wenn man auf das abgespülte Präparat 3 bis 4 Tropfen einer Lösung von Aurum chloratum neutrale 1:2000 bringt und 1 Minute ohne Erhitzung einwirken lässt; das Silber verwandelt sich dabei in Chlorsilber. Da 324 Theile Silber = 3 Atome nur 196 Theile Gold = 1 Atom niederschlagen, 1 Theil also nur 0.6 Theile Gold; ferner das gebildete Chlorsilber AgCl durchsichtig ist, so ist zunächst der Erfolg, dass die Geisseln abblassen, wie man sich leicht durch die mikroskopische Controle überzeugen kann. Das Chlorsilber lässt sich jedoch auch ohne Belichtung durch jeden photographischen Entwickler wieder zu Silber reduciren, so dass seine ursprüngliche Menge vermehrt um die des niedergeschlagenen Goldes in den Geisseln sich befindet. Ich benutze zur Reduction 1. eine Lösung von 2^{grm} krystallisiertes Soda in 100^{ccm} Wasser; 2. eine solche von 1^{grm} Pyrogallol in 20^{ccm} Alkohol, welchem 2 Tropfen Eisessig zugesetzt sind. Diese Lösung ist brauchbar, auch wenn sie sich nach einigen Wochen gelbbraun gefärbt hat.

Tropft man nun auf das Präparat nach dem Abspülen der Goldlösung 4 Tropfen Soda- und 1 bis 2 Tropfen Pyrogallollösung, lässt etwa 1 Minute nach dem Schwenken des Deckglases stehen oder erwärmt ganz gelinde, so ist die Reduction des Chlorsilbers vollzogen. Kräftig gebeizte Präparate erfordern kaum eine nochmalige Behandlung nach demselben Verfahren; verstärkt man zum zweiten Mal, so wächst die Metallmenge von 1 Theil Silber auf $1 + 0.6 + 0.6$, also auf mehr als die doppelte Menge. Nieder-

schläge habe ich bei dieser Verstärkungsart niemals beobachtet; nur werden selbstverständlich auch die Unsauberkeiten des Untergrundes wie Bruchstücke von Geisseln in gleicher Weise gekräftigt und fallen daher stärker dem Auge auf als vorher.

c) Verstärkung mit Quecksilberchlorid.

Ausgiebiger als die Verstärkung mit Goldchlorid ist diejenige mit Sublimat, daher anzuwenden, wenn die Geisseln sehr fein sind oder der nach IVa erhaltene Silberniederschlag wegen zu wenig kräftiger Beizung nur gering ausgefallen ist. Bringt man auf das Präparat alsdann 4 bis 5 Tropfen Sublimatlösung 1:100, so verwandelt sich in 0.5 bis 1 Minute das Silber in Chlorsilber, während zu gleicher Zeit das Quecksilberchlorid in Chlorür übergeht und mit dem Chlorsilber sich innig mischt. Da beide Verbindungen durchsichtig sind, so blasst auch in diesem Falle das Präparat und zwar noch stärker ab, als bei der Behandlung mit Goldchlorid. Statt der wenig Kraft verleihenden Schwärzungsmethoden mit schwefligsaurem Natron oder verdünntem Ammoniak, wie sie in der photographischen Praxis bei Gelatineplatten üblich sind, benutze ich die unter IV b angegebene Reduktionsmischung von Pyrogallol und Soda, wodurch auch das Quecksilberchlorür in metallisches Quecksilber umgewandelt wird. Da 1 Atom Silber die Bildung von 1 Mol. Quecksilberchlorür veranlasst und aus diesem 1 Atom Quecksilber reducirt wird, so hat sich die Metallmasse im Verhältniss der Atomgewichte von Silber zu Quecksilber, d. h. von 108:200 oder von 1:1.85 vermehrt. Lässt man nun die Verstärkung mit Goldchlorid IV b folgen, so schlägt sich nicht nur an Stelle des Silbers, sondern auch an derjenigen des Quecksilbers Gold nieder. Unter der ungünstigsten Annahme, nämlich das hierbei lösliche Quecksilberchlorid entsteht und beim Spülen ausgewaschen, alles Quecksilber also wieder entfernt wird, setzen sich an Stelle von 3 Atomen Quecksilber 2 Atome Gold. Dem Gewichte nach erhält man statt 600 Theile Quecksilber 400 Theile Gold oder 0.66 Theile der Quecksilbermenge. Da das Silber ebenfalls 0.6 Theile seines Gewichtes an Gold niedergeschlagen hat, so erhält man durch diese Verstärkungsart bei einmaliger Anwendung statt der ursprünglich in den Geisseln vorhandenen Menge Metall die 2.8 fache, bestehend aus 1 Theil Silber und 1.8 Theilen Gold. Durch Wiederholung der Verstärkung, sei es mit Goldchlorid allein oder mit Quecksilberchlorid, kann man die Menge des Goldes fernerhin vermehren. Das Hauptgewicht bei Herstellung von Geisselpräparaten lege ich jedoch auf gute Beizung und bin meist mit doppelter Goldverstärkung IV b oder einfacher Quecksilberverstärkung ausgekommen. —

Zum Erhitzen der Flüssigkeiten auf den Deckgläsern habe ich mich folgender Einrichtung mit Nutzen bedient. Ein Streifen Weiss- oder Schwarzblech, mittelstark, 4-5^{cm} breit, 24^{cm} lang, wird derartig gebogen, wie es die Figur andeutet; dann auf einem kleinen Brett, 1-5 bis 2^{cm} dick, 6 bis 7^{cm} breit, 12 bis 13^{cm} lang, mit Nägeln befestigt und zum Erhitzen des Vorsprunges *a* durch eine Flamme auf einen Dreifuss gelegt; zwei an die Längsseiten angenagelte, 20 bis 22^{cm} hohe Bleche, an den unteren Kanten 1 bis 1-5^{cm} nach aussen gebogen, können den Dreifuss ersetzen. Legt man nun die Zange mit dem Deckglas so auf, dass das letzteres sich über dem Vorsprunge *a* befindet, so wird es sehr gleichmässig erhitzt; in Folge dessen gehen die Umsetzungen auch an allen Stellen des Präparates gleich stark vor sich.

Zum Auftropfen der Lösungen eignen sich am besten ausgezogene Glasröhren; bei der Lösung des Pyrogallol in Alkohol setzt man eine solche mit feiner Oeffnung, oben im rechten Winkel gebogen, fest in den die Flasche verschliessenden Kork ein; beim Umkehren der nur halb oder ein Drittel gefüllten Flasche fliessen dann 1 bis 2 Tropfen aus; ihre Menge kann vermehrt werden, wenn man den Leib der Flasche mit der Hand ganz umfasst, weil die erwärmte, sich ausdehnende Luft dann mehr Flüssigkeit herausdrückt.

Nach Niederschrift des Vorstehendem habe ich gleichsam zur Probe auf das Exempel mit neu dargestellter Antimonbeize und Aethylamin-Silberoxyd 9 Arten von Bakterien, von denen ich vorher Geisselpräparate noch nicht angefertigt hatte, gefärbt, nämlich 1. Rauschbrand, 2. Tetanus, 3. *Bacillus spinosus*, 4. *Bacillus liquefaciens magnus*, 5. *Bacillus alvei*, 6. *Bacillus oxalaticus*, 7. *Bacterium pyocaneum*, 8. *Vibrio Nordhafen*, 9. eine Fluorescensart mit sehr langen Geisselbüscheln. Bei allen zeigte das erste Präparat die Geisseln so kräftig gefärbt, dass nur einmalige bei Nr. 9, zweimalige Verstärkung mit Goldchlorid nothwendig war; Nr. 6 und 9, direct von Agarcultur ohne Auswaschen ausgestrichen, wiesen nur einzelne völlig klare und tadellose Stellen auf. Geisselzöpfe habe ich in den jungen anaëroben Culturen nicht beobachtet.