(Aus dem Institut für Infektionskrankheiten „Robert Koch“ zu Berlin [Abteilungs-
direktor: Prof. Dr. Cl. Schilling].)

Über das Wachstum von Tuberkelbacillen in eidotterhaltigen flüssigen Nährböden.

Von

Eduard Boecker,

Assistent am Institut.

Eine neuartige Kulturflüssigkeit für Tuberkelbacillen, die lediglich in einer durch Alkalizusatz geklärten 5proz. Auflösung von Hühnereidotter in destilliertem Wasser besteht und durch rasches, ergiebiges, submerses Wachstum eingesäter Tuberkelbacillen bemerkenswert ist, wurde vor kurzem von Besredka¹⁾ angegeben. Die nachstehende Mitteilung betrifft Beobachtungen, die an rund 100 Einzelkulturen von Tuberkelbacillen in diesem und in ähnlich zusammengesetzten flüssigen Nährböden angestellt wurden.

Nach der Vorschrift von Besredka soll eine wässrige Dotteremulsion vorsichtig bis zum Auftreten leichter Transparenz mit „solution de soude à 1 p. 100“ versetzt werden. Bei der Nachprüfung stellte ich zunächst zum Zwecke der Vergleichung zwei Arten von Nährböden: mit Sodalösung oder mit Natronlauge her. Ein Unterschied in Grad und Art des Wachstums der Bacillen war nicht zu erkennen. Die dem nachfolgenden Bericht zugrunde liegenden Beobachtungen wurden an mit 1proz. Sodalösung geklärten Nährböden gemacht. — Die Feststellung des Umschlages im Aussehen der Dotteremulsion unterliegt naturgemäß subjektiven Schwankungen. Nicht selten sah ich in anscheinend genügend geklärten Nährlösungen nachträglich, mit oder ohne Einsaat, einen weißlichen, schlammartigen, bei längerem Schütteln der Kölbchen sich restlos verteilenden Bodensatz, und auf der Oberfläche der Flüssigkeit eine ebenfalls durch Schütteln verteilbare Haut vom Aussehen einer Kahmhaut auftreten, ohne daß übrigens in solchen Kölbchen das Wachstum der Tuberkelbacillen beeinträchtigt gewesen wäre. Zur Vermeidung von Verunreinigungen empfiehlt es sich, die Eier nach Dorset vor der Eröffnung kurz mit Carbolsäure zu waschen, an den Polen abzuflammen und mit sterilen Instrumenten zu öffnen.

Um die Leistungsfähigkeit der Nährflüssigkeit zu prüfen, habe ich in vielen Fällen relativ kleine Einsaaten eingebracht: bei erster Anlage

kleine Partikelchen von Schwimmrasen 2–6 wöchiger Glycerinbouillonkulturen, die oft nur von halber Stecknadelkopfgröße waren. Subkulturen wurden nicht selten durch Übertragung eines kleinen Tröpfchens aus einem bewachsenen Kölbchen vermittels einer linsengroßen Spiralöse, stets mit Erfolg, beimpft. Die Einsaat geschah stets in die Flüssigkeit hinein; Schwimmkulturen wurden nicht versucht. — Die Wachstumsprüfung wurde in der Weise vorgenommen, daß den geschüttelten Kölbchen eine Spiralöse Flüssigkeit entnommen und Präparate nach Ziehl-Neelsen angefertigt wurden. Soweit nicht Verunreinigung durch fremde Bakterien störend einwirkte, sind sämtliche Kulturen angegangen: 22 erster Generation und 10 zweiter bis vierter. Abgesehen von vereinzelten Kulturen, in denen zu Beginn einzelne Bacillen — auch im hängenden Tropfen — zu beobachten waren, traten die Bacillen stets nur in Verbänden auf. Diese Verbände waren entweder von unregelmäßig krümeliger Form oder schlangen- und zopfartig gewundene Bänder mit verzüngten Enden. Letztere häufigste Wuchsform hat als die typische zu gelten. Mit zunehmendem Alter nehmen die Verbände an Größe zu; die Zöpfe verzweigen sich und bilden schließlich Gitter, die sich über 1–2 Gesichtsfelder erstrecken. Vermehrungsgeschwindigkeit und Ergiebigkeit des Nährbodens lassen sich aus nachfolgendem Protokollauszug erkennen, der sich auf eine Folge typisch verlaufener Kulturen bezieht. Stamm human. B. I. Generation: 3. IX. 50 ccm Eiernährboden werden mit halbstecknadelkopfgroßem Stückchen 14tägigen Schwimmrasens submers beimpft. 10. IX. Im Präparat viele einzelne Bacillen. 15. IX. Desgleichen; daneben Gruppen von 5–50 Bacillen. — II. Generation: 16. IX. 30 ccm werden mit 1,5 ccm Flüssigkeit aus dem Kölbchen der I. Generation beimpft. 21. und 23. IX. Bacillen 0. 24. IX. Viele einzelne Bacillen. 27. IX. Wenige krümelige Verbände und Zöpfe von etwa 30 μ mittlerer Länge. — III. Generation: 27. IX. 40 ccm werden mit 1 Spiralöse Flüssigkeit aus Kölbchen II beimpft. 3. X. Bacillen 0. 12. X. Mehrere krümelige Gruppen von etwa 25 μ mittlerer Dimension. 15. X. Viele Zöpfe und Gruppen, kleinste bis sehr große, von etwa 6–80 μ Dimension. — IV. Generation: 20. X. 40 ccm mit 3 ccm aus Kölbchen III beimpft. 24. X. zahlreiche 5–100 μ große Zöpfe und Gruppen.

Neben dem erwähnten Stamm human. B. wurde noch mit human. J. und bovin. 5 gearbeitet, die sich ganz wie jener verhielten. Es handelte sich um Stämme, die seit längerem im Laboratorium gezüchtet worden waren. Eine Anzahl von Kulturen, die mit Partikelchen von frischer tuberkulöser Meerschweinchenmilz beimpft wurden, gingen nicht an; ebenso war Beimpfung mit stark bacillenhaltigen gewaschenen Sputumflocken ohne Erfolg, trotzdem diese Kölbchen sonst steril blieben.

In der neuen Kulturflüssigkeit nach Besredka liegt ein den Tuberkelbacillen sehr zusagendes Medium vor. Wegen der Unsicherheit solcher Beurteilungen soll von einem Vergleich mit der Leistungsfähigkeit älterer flüssiger Nährböden abgesehen werden. Bei der Beurteilung des Berichtes Besredkas ist zu berücksichtigen, daß er sich auf reichliche Einsaaten bezieht; auch dürfte er wohl vorzüglich das Verhalten eingewöhnter Bacillen vor Augen gehabt haben. Daß Gewöhnung an den Nährboden die Vermehrungsrate hebt, glaube ich mehrfach beobachtet zu haben.

Das Schwimmrassenwachstum der Tuberkelbacillen auf Glycerinbouillon (2%) erfolgt bedeutend rascher und ergiebiger, wenn man die 50 ccm haltenden Kölbchen mit etwa 1 ccm Eidotter versetzt — gleichgültig, ob die fertige Nährlösung vor der Beimpfung 1 Stunde bei 100° sterilisiert oder der Dotter unter sterilen Kautelen zugefügt und ungekocht belassen wird. Ähnliche Vorteile gegenüber der Glycerinbouillon stellte Besredka 1913²⁾ an seinem älteren, mit Dotter und Eiweiß versetzten Glycerinbouillonährboden fest. In derartigen Nährflüssigkeiten erfolgt neben dem Schwimmrassenwachstum der aufgelegten Bacillenschuppen vielfach gleichzeitig, von den letzteren ausgehend, ein mehr oder weniger intensives Wachstum der Bacillen submers in der Flüssigkeit selbst. In Verfolgung dieser Wachstumsverhältnisse gelangte ich zu der Feststellung, daß sich eine mit etwa 1,3 Volumprozent Dotter versetzte, darauf 1 Stunde im Dampftopf sterilisierte gewöhnliche Glycerinbouillon bei rein submerser Beimpfung nach Art und Maß des Wachstums der Bacillen wie der oben besprochene Nährboden nach Besredka verhielt. Wie dort, genügte auch hier minimale Beimpfung, bei Subkulturen Weiterverimpfung mit der Spiralöse. Das Beobachtungsmaterial umfaßt bisher 10 in verschiedener Weise angelegte Kulturen I. Generation und 12 meist mit der Öse beimpfte Subkulturen II.—IV. Generation. Außer den erwähnten Stämmen human. B. und bovin. 5 kam hier noch ein Laboratoriumsstamm human. Lu. zur Anwendung. — Um die Dottergerinnung bei der Sterilisation möglichst feinkörnig erfolgen zu lassen, wurde ein in 100 ccm Wasser verteiltes Dotter für 30 Min. im Wasserbad auf 70 bis 75° erhitzt und von der durch eine dünne Schicht Glaswolle geseihten Lösung je 5 ccm in die 50 ccm fassenden Glycerinbouillonkölbchen gegeben, die darauf für 1 Stunde in den Dampftopf kamen.

Literaturverzeichnis.

- ¹⁾ Ann. de l'inst. Pasteur **35**, Nr. 5. 1921. — ²⁾ Ibidem 1913, S. 1009.
-