

Unglasiertes Porzellan als Kulturunterlage für Mikroben.

Von
F. Fuhrmann.

Aus dem Institut für biochemische Technologie und Lebensmittelchemie
der Technischen Hochschule Graz.

Mit 2 Abbildungen.

(Eingelangt am 22. April 1946. Vorgelegt in der Sitzung am 27. Juni 1946.)

Schon seit langer Zeit bedient man sich in der mykologischen Versuchs- und Untersuchungstechnik fester anorganischer Stoffe als Unterlage für Bakterien- und Pilzkulturen. Nach den Angaben *Klöckers*¹ hatte seinerzeit *Engel* für die Sporenzüchtung bei Blastomyzeten Gipsblöcke vorgeschlagen, die *E. Chr. Hansen*² bei der Bestimmung der Sporulations-Kardinalpunkte von Saccharomyzeten erfolgreichst benützt hatte. *Schiönning*³ stellte die Gipsplattenkulturen mit Verwendung der Kulturkölbchen von *Hansen* her, wodurch er einen weitgehenden Schutz der Sporenzuchten gegen bakterielle Infektionen aus der Luft erzielen konnte. Die Sterilisation aller Arten von Gipsplatten bietet insofern Schwierigkeiten, als von ihnen Temperaturen über 120° C schlecht vertragen werden. Auch die Reinigung benützter Gipsplatten ist umständlich und kann bestenfalls nur einige Male wiederholt werden.

Die Ursache für die Verwendung derartiger anorganischer fester Platten bildet die schon von *E. Chr. Hansen* im Jahre 1883 mitgeteilte Kenntnis der näheren Bedingungen und Umstände, die eine rasche und ausgiebige Sporenbildung bei den Hefen bedingen. Diese brauchen für die Sporulation in erster Linie eine beständig feucht gehaltene feste Fläche als Unterlage, die guten Luftzutritt besitzt und Temperaturen bis zu 35° C aushält.

¹ Die Gärungsorganismen. Stuttgart: Waag. 1900.

² Les ascospores chez le genre *Saccharomyces*. C. R. Trav. Lab. Carlsberg, T. II, H. 2 (1883).

³ Nouvelle et singulière formation d'ascus dans une levure. C. R. Trav. Lab. Carlsberg, T. IV, H. 1 (1895).

Der bis zur Hälfte in Wasser eingetauchte Gipsblock entspricht diesen Forderungen vollkommen, weshalb sich bei Anwendung dieses Verfahrens stets reichlich Sporen in den Hefezellen ausbilden, sofern die Hefen jung und wohlgenährt darauf ausgesät werden. Ähnliches zeigen auch die in voller Entwicklung stehenden sporenbildenden Spaltpilze.

Ob dabei das Kalziumsulfat selbst insofern mitwirkt, als ja Gips sich im Wasser nicht unbeträchtlich löst und infolge der sehr starken Feinporigkeit des erhärteten Gipses die Abfuhr und die damit verbundene Verdünnung der entstehenden Stoffwechselprodukte gedrosselt wird, scheint bisher kaum berücksichtigt worden zu sein.

Jedenfalls ist ein in seinen physikalischen Wirkungen mindestens gleichwertiges, in Wasser und in Nährflüssigkeiten praktisch aber *unlösliches* Material dem Gipse vorzuziehen. Dies gilt besonders für jene Fälle, bei denen es sich nicht so sehr um die Erreichung einer Massensporenbildung als vielmehr um die Erfassung der bei der Sporulation sich bildenden *Stoffwechselprodukte* handelt. Auch der Einfluß von bestimmten organischen Verbindungen und von Anionen und Kationen auf die Dauerformbildung kann nur dann ermittelt werden, wenn das Unterlagensubstrat selbst indifferent ist. Sonach darf es in Wasser *nicht löslich* sein und auch von Flüssigkeiten mit H-Ionenkonzentrationen entsprechend $p_H = 2$ bis $p_H = 9$ *nicht* angegriffen werden. Brauchbares Unterlagematerial muß ferner eine Porosität gleicher Weite zur Erreichung günstiger Diffusionsverhältnisse besitzen. Dabei muß aber eine Porenenge gewählt werden, die eine Durchwachsmöglichkeit für kleinste, auch eigenbewegliche Spaltpilze sicher ausschließt.

Für Sporulationsversuche wurden an Stelle der Gipsblöcke auch aus anderen Materialien hergestellte Platten und Zylinder schon vor längerer Zeit anzuwenden versucht, wie z. B. von *Elion* Würfel aus gebranntem Ton oder von *Wichmann* Schamotteblöcke, also Unterlagen, die der Forderung nach Unlöslichkeit befriedigend nachkamen, jedoch in bezug auf Porengröße bei Schamotte und Gleichmäßigkeit der Poren beim Ton nicht entsprachen. Gebrannter unglasierter Ton verträgt übrigens die Dampfsterilisation sehr schlecht und wird durch Auskochen mürbe.

Daher habe ich zum *Porzellan* gegriffen, dessen Porosität hinsichtlich Porengröße und Porenleichheit den jeweiligen Bedürfnissen entsprechend bei der Herstellung angepaßt werden kann. Die *Staatliche Porzellanmanufaktur* in *Berlin* stellte mir bereits im Jahre 1942 unglasierte Probeplatten zur Verfügung, mit denen eingehende Versuche in bezug auf Diffusionsvermögen und Durchwachsmöglichkeit für kleinste eigenbewegliche Bakterien angestellt wurden. Am besten eignete sich die „poröse Masse P 1“, da bei der Verwendung von aus ihr gemachten Platten bei sehr guter Diffusion jede Durchwachsung selbst bei abnorm langer Zucht ausblieb.

Aus dieser Porzellanmasse stellte die genannte Manufaktur nach eingesandter Maßskizze kreisrunde Platten von 55 mm Durchmesser und 7 mm Dicke her, die je drei auf den Umfang gleichmäßig verteilte Füßchen von 3 mm Höhe besaßen. In der Abb. 1, 1, ist eine solche Platte abgebildet. Um ein Überkriechen oder Überwachsen aufgebrachtener Mikroben über den Plattenrand auszuschließen, wurde derselbe in einer Breite von 4 mm und die Seitenfläche der Scheibe glasiert. Dadurch ist auch die nutzbare Oberfläche der Platte gegenüber dem glasierten Rand ein wenig vertieft.

Um alle von der Herstellung stammenden unlöslichen und löslichen Verunreinigungen zu entfernen, werden vor dem Gebrauch die Platten mit Seife und Bürste gründlich mechanisch gereinigt und dann in ver-

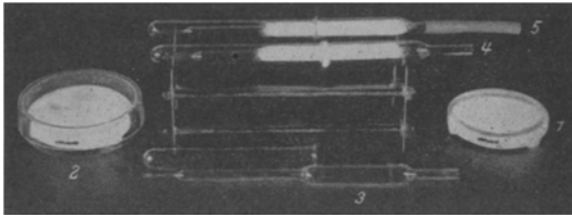


Abb. 1.

dünnter HCl (1 : 20) 12 Stunden geweicht und 1 Stunde ausgekocht. Hierauf folgt eine 24stündige Wässerung in fließendem Leitungswasser und schließlich eine eintägige Behandlung mit destilliertem Wasser, das stündlich gewechselt wird. Nunmehr werden die Platten bei 105° C getrocknet und in wohlverschlossenen Standgläsern aufbewahrt.

Ihre Verwendung in der mykologischen und biochemischen Untersuchungstechnik ist äußerst mannigfaltig, weshalb hier nur ausprobierte Anwendungen näher beschrieben werden sollen.

1. Sporengewinnung.

Zu diesem Zwecke werden die vorgereinigten Porzellanplatten einzeln in etwa 1 cm weitere Petrischalen mit lose tiefübergreifendem Deckel eingestellt und in die Schale mit einem Spitzrohr frisch abgekochtes und erkaltetes Leitungswasser so hoch eingefüllt, daß die Unterseite der Porzellanscheibe ungefähr 1 mm in das Wasser eintaucht. So bleiben sie 24 Stunden lang stehen. Dann werden sie im Dampfschrank wie üblich diskontinuierlich sterilisiert. Abb. 1 zeigt in 2 die gebrauchsfertige Zusammenstellung. Sollte eine Platte soviel Flüssigkeit aufgenommen haben, daß der Wasserspiegel unter ihre Unterfläche absinkt, füllt man mit einer sterilen Pipette soviel steriles Wasser bei möglichst wenig ab-

gehobenem Schalendeckel nach, daß die Scheibenunterseite wieder ein wenig eintaucht.

Zur Bakteriensporenzüchtung verwendet man nur junge in voller Entwicklung stehende Agar- oder Gelatinekulturen, deren Mikrobenrasen mit einer Platinöse abgenommen und in dünner Schicht auf die Porzellanplatte ausgestrichen wird. Da die Sporen sich am schnellsten und besten bei gutem Luftzutritt zu bilden pflegen, empfiehlt es sich, Dosen zu verwenden, deren Schalenrand einige kleine dreieckige Ausnehmungen hat, so daß der aufgesetzte Deckel das Schaleninnere nicht völlig abschließt. Zum Nachfüllen sterilen Wassers benützt man die später beschriebenen Pipetten.

Bei sorgfältiger Arbeit bleibt selbst bei langer Zuchtdauer und oftmaligem Lüften des Deckels zwecks Entnahme von Sporenproben jede Infektion des Feuchtwassers und der Plattenoberfläche aus.

2. Untersuchung des Einflusses gelöster Stoffe auf die Sporulation.

Will man nun den Einfluß von Nährlösungen oder Salzlösungen auf die Sporenbildung untersuchen, dann bringt man, wie oben dargestellt, sie an Stelle des Wassers in die Schale. Und gerade in diesen Fällen ist die *Keimfreiheit* dieser Lösungen trotz in ihnen auf der Plattenoberfläche vorgenommenen Mikrobenzüchtung von besonderem Werte und Vorteile. Man hat die Möglichkeit, jederzeit sozusagen „*nährbodenfrei*“ die Zellen für die morphologische Untersuchung von der Porzellanoberfläche abzunehmen. Umgekehrt besteht jederzeit die Möglichkeit, kleine Mengen der verwendeten Lösungen „*zellenfrei*“, also steril aus der Schale zu nehmen. Bei der Empfindlichkeit der heutigen mikrochemischen Reaktionen können wir an diesen zellenfreien Proben in reinster Form die infolge des Mikrobewachstums eingetretenen Veränderungen der ursprünglichen Zusammensetzung qualitativ und vielfach auch quantitativ verfolgen und erfassen. Ebenso sind physiko-chemische Messungen an ihnen unschwer auszuführen.

Wenn es sich nur um die Feststellung der günstigsten Bedingungen für die Sporulation handelt und keine Untersuchung der Veränderungen des Befeuchtungsmittels vorgenommen wird, benützt man zweckmäßig zum Einstellen der Platten große Doppelschalen. Dadurch erreicht man, daß im Verhältnis zur Menge des sporulierenden Materials auf der Platte die Flüssigkeitsmenge sehr groß wird. Damit erzielt man eine praktisch so starke Verdünnung der Stoffwechselprodukte, daß sie auf Sporenbildungsvorgänge wirkungslos werden und als Fehlerquelle bei der Beurteilung der Lösungseinflüsse ausscheiden.

Sowohl zum Einfüllen der Lösungen als auch zur Entnahme während der Züchtung werden sterile Pipetten verwendet, wie sie Abb. 1 in 3, 4

und 5 zeigt. Um sofort gemessene Mengen aus diesen Pipetten ausfließen zu lassen, hält man sich einige mit entsprechender Teilung vorrätig. Die Ausflußspitzen unserer Pipetten haben eine innere Lichte von 1 mm, das Pipettenrohr eine solche von 4 mm, während die Rohrlänge bis zum erweiterten zylindrischen Ansatz 80 mm mißt. Dieser ist 50 mm lang und 8 mm weit, während das Ende desselben in ein ebenfalls 4 mm weites, 20 mm langes Rohr übergeht. Zu jeder Pipette gehört eine Rohrkappe. Der erweiterte Ansatz dient nach einer Füllung mit Watte als *Luftfilter* beim Aufsaugen und Ablassen der Flüssigkeit. Die derart vorbereitete Pipette wird mit Hilfe einer Watteeinlage in das Kappenrohr eingeschoben und in dieser Zusammenstellung im Heißluftschrank bei 150° C in der üblichen Weise sterilisiert. Abb. 1 hat in 4 eine sterile Pipette im Aufbewahrungszustande abgebildet. Vor dem Gebrauch setzt man die Kautschukkappe auf, wie es aus 5 der Abb. 1 zu entnehmen ist. Erst *unmittelbar* vor dem Gebrauch der Pipette zur Flüssigkeitsentnahme aus der Schale, die nicht weiter als unbedingt erforderlich geöffnet wird, entfernt man das Kappenrohr.

3. Die Mikrobenreinkultur auf der Porzellanplatte.

Wenn auch die heute verwendeten Reinkulturmethoden für Pilze und Bakterien, angefangen von der *Kochs*chen Platte bis zur Tuschemethode *Burris* und bis zum Einfangen und Übertragen einzelner Zellen mit Hilfe der Mikromanipulatoren unter der unmittelbaren mikroskopischen Kontrolle die Auslese von Bakterienarten ermöglichen, so bieten sich doch Schwierigkeiten und oft unüberwindliche Hindernisse, wenn alle in einem Bakteriengemisch vorhandenen Arten erfaßt und reinkultiviert werden sollen. Solche Forderungen werden von nahrungsmitteltechnischen Betrieben und besonders in Trinkwasserwerken oft gestellt. Hier versagen alle bisherigen Platten- und Tröpfchenmethoden und auch die Isolierung mit Mikromanipulatoren führt nicht zum Ziel, weil die erstgenannten Methoden den vielfältigen Sonderansprüchen der verschiedenen Arten nicht genügen können und bei der letztgenannten Isolierungsmethode aus dem verschiedenem Aussehen der einzelnen Zellen ihre Artzugehörigkeit kaum erkannt werden kann. Auch viele der so isolierten und auf sterile Nährböden übertragenen Keime wachsen und vermehren sich überhaupt nicht mehr. Einer vollständigeren Erfassung der in einem Gemisch befindlichen Bakterienarten kommt man nur mit den verschiedenen Tröpfchenmethoden etwas näher, wenn man sehr große Reihen mit verschiedenen Nährsubstraten anlegt und unter sehr unterschiedlichen äußeren Verhältnissen sich entwickeln läßt.

Zur Reinzucht können *Gelatineplatten* nur dann verwendet werden, wenn es sich um Mikrobenarten handelt, deren Temperaturoptimum für das Wachstum *unter* 25° C liegt. In diesem Falle wird das Wachstum

aller anderen vorhandenen, an höhere Temperaturen angepaßten Spezies unterdrückt. Es darf auch nicht vergessen werden, daß die raschwüchsigen Arten sehr reichlich Stoffwechselprodukte ausscheiden, die sich in der nächsten Umgebung anhäufen und von dort aus in die weitere Umgebung diffundieren. Dadurch wirken sie auf ihr eigenes weiteres Wachstum ungünstig und hemmen gleichzeitig die Entwicklung der anderen in der Ausstrahlungszone liegenden Zellen bei der Koloniebildung. Es ist lange bekannt, daß z. B. die Kolonien des *Bacillus pyocyaneus* ihre Umgebung durch das von ihnen erzeugte und abdiffundierende Pyocyanin keimfrei halten, also jedes Wachstum anderer Arten verhindern.

Die Verwendung von *Agarplatten* und *Agargelatineplatten* zur Reinkultur bei Temperaturen über 25° C bereitet infolge des Auftretens von Kondenswasser an der Oberfläche Schwierigkeiten. Man ist gezwungen, die Platten steril zu gießen und dann die Verdunstung des Kondenswassers abzuwarten, was immer einige Tage erfordert. Dann erst kann man das aufgeschwemmte Bakterienmaterial mit einer Glas- oder Platinnadel oder dem später beschriebenen Platinpinsel aufstreichen. Vor neuerlicher Kondenswasserbildung ist man aber keineswegs sicher, denn ein Ansteigen der Temperatur um nur wenige Grade über jene Temperatur, bei welcher die Verdunstung erfolgte, bewirkt eine schwache Kondenswasserbildung, die aber genügt, Kolonien ineinanderfließen zu lassen.

Bei allen *Gallerteplatten* muß eine hinlänglich dicke Schichte zur Erstarrung gebracht werden, nachdem in der flüssigen Gallerte die Mikroben möglichst gleichmäßig verteilt worden sind. Charakteristische Merkmale feinerer Art zeigen aber nur die an der *Oberfläche* zur Ausbildung gelangenden Kolonien und auch nur diese werden in der Regel zur Abimpfung verwendet. Innerhalb der ersten 24 bis 48 Stunden entwickeln sich aber nur jene lebensfähigen Keime zu kleinen Kolonien, die bei der einsetzenden Erstarrung der Gallerte sich gerade an der Oberfläche befunden haben und dort festgehalten wurden. Wie die Erfahrung zeigt, bleiben in dieser günstigen Lage auf der Oberfläche von der Größe der gebräuchlichen Petrischale nur sehr wenige Zellen, die dann in ihrer Entwicklung den anderen in der Tiefe voraneilen. Die in der Nährbodenmasse mehr oder minder tief eingebetteten Keime wachsen langsam zu meist uncharakteristischen Häufchen aus. Erst wenn Teile dieser Ansammlungen die Oberfläche der Gallerte erreichen, bilden sich von dieser Stelle ausgehend einigermaßen typische Kolonien aus, was mehrere Tage erfordert.

Eine befriedigende Methode der Reinzüchtung bei gleichzeitiger Erfassung möglichst aller in einem Gemisch befindlichen Arten müßte grundsätzlich darin bestehen, auf einer Fläche in entsprechender Entfernung oder passendem Abstände voneinander Mikrobenzellen festzuhalten und ihnen dabei die lebensnotwendigen Nahrungsstoffe in gelöster Form zuzuführen und gleichzeitig die entstehenden Stoffwechselprodukte

wegzuschaffen und endlich die Anwendung beliebiger Temperaturen innerhalb 0 und 80° C und die Zucht im Vakuum und beliebigen Gasen bei Drucken bis 1 Atü zuzulassen.

Allen diesen Belangen kommt nun die beschriebene unglasierte Porzellanplatte weitgehend entgegen. Sie ist der gegebene Träger allein und in Verbindung mit Gelatine, Agar, Blutserum, Albumin u. dgl. und infolge ihrer Porosität der Transporteur für die Zufuhr der Nahrung und die Abfuhr der Stoffwechselprodukte.

Für die Gewinnung von Reinkulturen mit Hilfe der Porzellanplatte habe ich im wesentlichen zwei Grundmethoden ausgearbeitet, die nebenbei ein äußerst sparsames Arbeiten in bezug auf den Verbrauch von Gelatine, Agar und Reagenzien gestatten.

A. Flüssigkeitsverdünnungsmethoden.

Grundsätzlich werden bei diesen Methoden die Bakterien oder Hefen in verflüssigter Gallerte *ohne* jeglichen Zusatz von Nährstoffen zur Anlage von Verdünnungen aufgeschwemmt. Die notwendigen Nährstoffe werden hingegen als reine Nährlösungen ohne Gallertezusatz bereitet und verwendet.

Die Durchführung dieser Methode erfordert folgende Vorbereitungen:

1. Kleine Proberöhren mit je 2 ccm steriler Gelatine.
2. Normal große Proberöhrchen mit Nährlösungen entsprechender Zusammensetzung.
3. In Doppelschalen eingestellte Porzellanplatten, sterilisiert.
4. Sterile Wattetamponstäbchen.
5. Platinösen von 4 mm Durchmesser, Platinimpfnadeln.
6. Sterile Pipetten der früher beschriebenen Art.

Die *Verdünnungen* zur Aussaat der Bakterien werden nach dem Kochschen Prinzip in kleinen Proberöhrchen von 10 mm innerer Weite und 12 cm Länge in verflüssigter Gelatine hergestellt. Um den eingebrachten Zellen günstige osmotische Verhältnisse zu schaffen, löst man die Gelatine in einer 0,5%igen NaCl-Lösung. Auf 100 ccm Kochsalzlösung nimmt man 2,5 g Gelatine, die man vor der Lösung im Dampfschrank einige Stunden quellen läßt. Sobald sich die Gelatine gelöst hat, neutralisiert man die Lösung mit 0,1 n-Soda- oder NaOH-Lauge, wobei als Indikator Phenolphthalein verwendet wird. Mit je 2 ccm dieser neutralen Gelatinelösung werden die vorsterilisierten, mit Wattebäuschen verschlossenen Proberöhrchen gefüllt und fraktioniert sterilisiert.

Zur Herstellung der dünnen Flächenausstriche auf der Porzellanplatte dienen „Wattetamponstäbchen“, wie eines in Abb. 2, 1 abgebildet ist. Auf ein dünnes Holzstäbchen wird an einem Ende ein Wattetampon aufgedreht und das derart adjustierte Stäbchen in ein Proberöhrchen gesenkt, das mit einem Wattebausch verschlossen wird. So zubereitet werden die

Tamponstäbchen bei 140° C in Heißluft entkeimt und dann bis zum Gebrauch aufbewahrt.

Die *Platinösen* werden aus 0,3 mm dickem Pt-Draht gefertigt. Dabei ist darauf zu achten, daß die Öse vollkommen geschlossen ist, wodurch ein Abfließen der Flüssigkeit beim Übertragen derselben vermieden wird. Aus gleich starkem Material werden die *Impfnadeln* gemacht.

Die *Reinzucht* wird nun folgendermaßen durchgeführt: In einem Wasserbad von 30 bis 35° C wird in drei Röhrchen die Gelatine verflüssigt. Analog dem *Kochschen* Reinzuchtverfahren legt man in einem Röhrchen

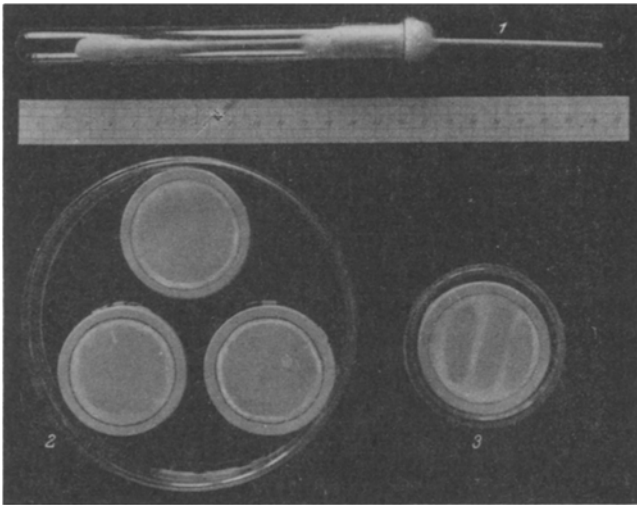


Abb. 2.

das „Original“ dadurch an, daß man in die Gelatine soviel von dem zu untersuchenden Bakterienmaterial einbringt, bis eine schwache Trübung der Gelatine zu bemerken ist. Durch vorsichtiges Schwenken wird nun eine gleichmäßige Durchmischung und Verteilung der eingepfunden Zellen vorgenommen. Aus diesem Original überträgt man jetzt drei Ösen voll in das zweite Röhrchen und mischt wieder sorgfältig durch. Mit der neuerlich ausgeglühten und erkalteten Öse überträgt man nun abermals drei Ösen voll aus dem zweiten Röhrchen (Verdünnung 1) in das dritte und mischt wieder sorgfältig durch. Damit ist die Verdünnung 2 angelegt. Eine genügende Durchmischung ist nach 50- bis 60maligem Umschwenken unter Vermeidung des Benetzens des Watteverschlusses erreicht. Während dieser Verdünnungsarbeit kühlt man die mit der gewählten Nährlösung und den Porzellanplatten beschickten Petrischalen, wie sie 2 der Abb. 2 darstellt, im Kühlschrank auf 0° ab. Ich benütze meist die mit drei

Platten ausgestatteten größeren Doppelschalen, um gleichzeitig von jeder Verdünnung drei Aufstriche machen zu können. Es bietet dies den Vorteil, nach dem Angehen der Kolonien für die Abimpfung nach verschiedenen Zeiten bei kurzer Lüftung je eine Platte entnehmen zu können, die dann *nicht* mehr in die Schale zurückgestellt werden, sondern als erledigt zur Reinigung kommen. Nunmehr taucht man einen Stäbchentampon in die erste Verdünnung bei schräg gehaltenem Röhrchen ein und läßt ihn sich vollsaugen. Jetzt bestreicht man in raschen und gleichmäßigen Zügen die Oberfläche der gekühlten Platten bis etwa 5 mm zum glasierten Rand, wie es aus 2 der Abb. 2 ersichtlich ist. Auf der gekühlten Platte erstarrt dieser dünne Aufstrich fast augenblicklich. Die Schale kommt nun in den Brütschrank und kann bei Temperaturen bis 22° C gehalten werden. Gleiches geschieht mit der Verdünnung 2. Auf den Aufstrich des Originals verzichte ich meist, da hier die Zellen sehr nahe aneinander liegen und es daher zu keiner brauchbaren Koloniebildung kommen kann.

Wenn man mit der Nährlösung besonders sparsam umgehen will, kann man auf *einer* Platte die Ausstriche beider Verdünnungen machen, wie es aus 3 der Abb. 2 zu erkennen ist. Dabei stellt man in entsprechender Entfernung von der Verdünnung 1 einen und von der Verdünnung 2 zwei Aufstriche her.

Die Reinkultivierung *anaerober* Bakterienarten mit dem neuen Plattenverfahren bietet keine Schwierigkeiten, wenn hierzu die von mir angegebenen Methoden zur anaeroben Bakterienkultur in Weckgläsern verwendet werden⁴. Dieses Verfahren ermöglicht auch die Zucht in beliebigen Gasen.

Wenn es sich um die Isolierung von Spaltpilzarten handelt, die ihr Wachstumsoptimum bei *höheren* Temperaturen haben, wird die Gelatine durch *Agar* ersetzt.

Die Handelsdroge „Agar-Agar“, einerlei von welcher Form, ist ihrer Herkunft und Bereitungsweise nach stark verunreinigt und enthält viele lösliche organische und anorganische Stoffe. Durch einfaches Auswässern erreicht man keine volle Reinigung. Deshalb lasse ich käuflichen Agar *anisfaulen*. Zu diesem Zwecke wird die zerkleinerte Droge, meistens handelt es sich um Fadenagar, in hohe und weite Standzylinder gebracht, die dann mit Leitungswasser gefüllt werden. Wegen der großen Quellfähigkeit dieses wasserunlöslichen Kohlehydrates darf man die Zylinder mit Agar nur bis zur Hälfte beschicken. Bei Zimmertemperatur gehalten, setzt alsbald ein mit Gasbildung verbundener Zersetzungsvorgang ein, der nach zirka 14 Tagen beendet ist. Dabei bleibt die *Gelose*, das Kohle-

⁴ F. Fuhrmann, Zur anaeroben Kultur in Weckgläsern. Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. II Bd. 104 (1942).

hydrat des Agars, auf die es ja ankommt, vollkommen unangegriffen. Nun wird 24 Stunden lang in fließendem Leitungswasser ausgewaschen und schließlich ebensolange in öfter gewechseltem *destilliertem* Wasser nachgewässert. Nun erfolgt die Trocknung des ausgefaulten Agars auf mit Organtin bespannten Hürden in einem staubfreien luftigen Raum bei Zimmertemperatur.

Für die Reinzucht benützen wir eine 0,3%ige Agargallerte, die genau so verarbeitet wird, wie früher für die Gelatine beschrieben. Es entfällt nur die Neutralisation, da ausgefaulte Agar neutral reagiert. Die Verflüssigung muß aber bei Siedetemperatur vorgenommen werden. Ohne Erstarrung kann dann auf 30° abgekühlt werden, bei welcher Temperatur die Verimpfung und das Aufstreichen erfolgt. Die wiedererstarrete Schichte wird erst wieder bei Temperaturen über 80° flüssig. Diese Eigenschaft gestattet es gerade, sehr hohe Züchtungstemperaturen anwenden zu können.

Wie schon früher angedeutet, zeigt die Agargallerte die unangenehme Eigenschaft, nach ihrer Erstarrung Kondenswasser auszupressen, das ihre Oberfläche überschwemmt, so daß angehende Oberflächenkolonien durcheinandergespült werden. Dadurch wird jede Isolierung unmöglich gemacht. Bei der überaus dünnen Agarschicht, die wir auf der Porzellanplatte herstellen, wirkt sich diese Eigenschaft nicht störend aus, weil die geringe Menge austretender Flüssigkeit sofort in das Porzellan diffundiert.

B. Isolierungsmethode durch Ausstrich.

Schon seit langer Zeit sind auch Methoden in Gebrauch, die Verdünnung in Flüssigkeiten durch sukzessives Abstreifen von Keimen von einem Platindraht oder Glasfaden auf eine Gelatine- oder Agarplatte zu ersetzen. Diese Verfahren der Mikrobenisolierung und Reinzüchtung lassen sich ohne weiteres mit Hilfe der Porzellanplatten durchführen und leiten sozusagen zur „*Porzellanplattenkultur*“ im allgemeinen über.

Bei dieser Isolierungsmethode legt man keine Verdünnungen in den verflüssigten Gallerten an, sondern schwemmt das Untersuchungsmaterial in Leitungswasser oder besser in einer sterilen physiologischen Kochsalzlösung auf. Zur Herstellung des Isolierstriches auf dem dünnen Agar- oder Gelatineüberzug der Porzellanplatte, der entweder mit der in A. angegebenen Gelatinelösung oder einer 0,3%igen Agarlösung mit dem Tamponstäbchen aufgetragen wurde, benützt man Platinnadeln oder Platinpinseln. Letzteren gebe ich den Vorzug. Der Platinpinsel, richtiger Platiniridiumpinsel genannt, wird von einem in das Ende eines Glasstabes eingeschmolzenen Bündel 0,03 bis 0,04 mm dicker Platiniridiumdrähte (zirka 20 Stück) in einer Länge von 3 cm gebildet. Reines Platin würde dafür zu weich sein. Einen solchen eben ausgeglühten und er-

kalteten Pinsel taucht man 2 cm tief in die Bakterienaufschwemmung ein und führt bei leichter schrägsteher Auflage des Pinsels parallele Striche aus, wobei sich die Keime längs der Striche verstreut auf der Gallertoberfläche abstreifen. Die weitere Züchtung erfolgt wie für A. angegeben.

4. Porzellanplatten-Mikrobenkultur.

Die unglasierte Porzellanplatte bietet aber auch als Unterlage für Bakterien- und Hefekulturen viele Vorteile gegenüber den bisher gebräuchlichen Flüssigkeitskulturen in Proberöhren und besonders gegenüber den Agar- und Gelatinekulturen in mehr oder minder großen Proberöhren. Denn sie allein ermöglicht eine strikte Trennung der sich entwickelnden Zellen von den sie ernährenden Lösungen. Diese sind und bleiben zellenfrei. Der Austausch der Stoffe erfolgt lediglich durch die Porzellanwand hindurch. Ich möchte sagen, die Ernährung, jede Mikrobenleistung und der Austausch aller Stoffe außerhalb der Zellen vollzieht sich reinlicher und kann in der dauernd steril bleibenden Flüssigkeit leichter überblickt werden. Wie schon einmal erwähnt, findet durch eine passende Auswahl und Anwendung des Verhältnisses zwischen Zellen- und Flüssigkeitsmenge eine so weitgehende Verdünnung der löslichen Ausscheidungsprodukte statt, daß eine Rückbeeinflussung des Wachstums von dieser Seite so gut wie ausgeschlossen ist. Jede chemische oder osmotische Wirkung auf das Zellenleben durch bestimmte Stoffe und Verbindungen in beliebiger Konzentration kann durch die Porzellanwand hindurch ausgelöst werden. Bei diesem neuen Zuchtverfahren treten auch die artspezifischen Wachstumsmerkmale, die sich in der Formung der ganzen Zelle und ihrer unter dem Mikroskop morphologisch erfassbaren Inhaltskörper ausdrücken, markanter hervor. Die Bakterien-systematik und Diagnostik erhält in diesem neuen Kulturverfahren einen wertvollen Behelf zur Feststellung der Entwicklungskreise der verschiedenen Bakterienarten auf einwandfreier Grundlage. Eine weitgehende Kenntniss der Entwicklungszyklen der Bakterien bildet schließlich und endlich doch die einzige verlässliche Basis für die Artenunterscheidung und Diagnose.

Die neue Kulturmethode beruht grundsätzlich darauf, auf einer dünnen, möglichst indifferenten, gallertigen Zwischenschicht, die auf die Porzellanplatte, wie früher bei der Reinzucht beschrieben, aufgebracht ist, Strichkulturen mit Hilfe einer sterilen Glas- oder Platinnadel anzulegen und die notwendigen Nährstoffe aus sterilen Nährlösungen auf dem Diffusionswege durch die Porzellanplatte hindurch zuzuführen.

Die praktische Durchführung dieser Kulturmethode bietet keine Schwierigkeiten. Die dünne Gallertzwischenschicht stellt man nach der in A. gegebenen Vorschrift mit einer 3%igen Gelatine- oder 0,3%igen Agarlösung her. Nach erfolgter Erstarrung führt man die Impfstrieche

mit der leicht auf der Oberfläche in geeigneter Stellung gezogenen Platinadel aus, wobei man auf einer Platte in einem Abstände von etwa 5 mm mehrere Striche parallel macht. Auf diese Weise wird die Oberfläche gut ausgenützt und man gewinnt größere Kulturmengen.

In die Schale kann man jede Art von flüssigen Nährböden bringen, einerlei welche Reaktion sie besitzen. Die weitere Züchtung erfolgt bei beliebiger Temperatur bis 75° C, so daß auch alle thermophilen Bakterienarten gedeihen. Die anaerobe Zucht läßt sich ohne weiteres in meiner Weckapparatur (l. c. S. 121) ausführen.

Wenn man besonders zeitsparend arbeiten will, kann man bei der Vorbereitung aller angegebenen Methoden die Flüssigkeitsdurchträngung der trockenen Platten im Vakuum vornehmen, wozu sich die genannte Weckapparatur sehr gut eignet. Schon nach wenigen Minuten zeigt dabei die Plattenoberfläche einen matten schwachen Glanz als Zeichen der vollzogenen Durchträngung.

Schließlich sei noch kurz auf besondere Verwendungsmöglichkeiten der Porzellankulturplatten hingewiesen.

Sehr gut läßt sich mit dieser Kulturmethode der Einfluß von Giften, überhaupt von allen löslichen diffusiblen Verbindungen auf die voll entwickelten Zellen untersuchen. Zu diesem Zwecke legt man zuerst von der Bakterienart unter Verwendung der günstigsten Nährflüssigkeit Plattenstrichkulturen an. Von solchen gut angewachsenen jungen Kulturen macht man mit der Platinöse Abstriche auf eine Porzellanplatte *ohne* Gallertzwischen-schicht, die von der zu prüfenden Lösung durch die Porzellanschicht hindurch benetzt wird. In stündlichen Zeitintervallen nimmt man dann mit der Impfnadel Bakterienproben ab und untersucht die eingetretenen Zellveränderungen.

In gleicher Weise lassen sich auch Desinfektionsmittel mit Testkulturen auf ihre bakterizide Wirkung prüfen, indem man mit den abgenommenen Bakterienproben Röhrenkulturen mit Fleischbrühe impft und mit solchen Reihenkulturen jene Einwirkungszeit ermittelt, nach welcher die Bakterien entwicklungsunfähig geworden sind. Unter diesen Bedingungen ist der Desinfektionsversuch einwandfrei, da die Desinfektionswirkung etwa hemmende Einflüsse von sonst beim Verimpfen mitübertragener Nährlösung ausgeschaltet sind.

Auch die gegenseitige Beeinflussung zweier Bakterienarten durch ihre ausgeschiedenen Stoffe kann mit Hilfe der Porzellanplatten untersucht werden. *Auf* die Platte mit der Gallertzwischen-schicht wird die eine Bakterienart verimpft und gezüchtet und gleichzeitig *in* die Nährflüssigkeit die andere Art eingesät. Bei dieser Versuchsanordnung haben wir zwei Bakterienarten räumlich getrennt in derselben Nährflüssigkeit, während ihre löslichen Ausscheidungsprodukte durch die Porzellanwand hindurch Zutritt zu beiden Arten haben.

Die Untersuchung der von den Bakterien erzeugten und von ihren *lebenden Zellen* in die Kulturflüssigkeit *abgegebenen Wirkstoffe* erfordert meistens eine Abscheidung der Zellen aus dem Nährsubstrat durch Ultrafiltration mit Über- oder Unterdruck. Solche Filtrationen verlaufen sehr langsam und sind infektionsfrei sehr schwierig durchzuführen, da keine Desinfektionsmittel zugegeben werden dürfen. Sie würden ja alle Bakterien töten und der Autolyse derselben Tür und Tor öffnen und damit alle löslichen Zellinhaltsstoffe in die Flüssigkeit gelangen lassen. Wir wollen aber nur die von den *lebenden Zellen* ausgesonderten Wirkstoffe in der zellenfreien Nährlösung untersuchen. Hier dürfte die Porzellanplattenkultur große Vorteile bieten.

Jedenfalls weisen die aufgezeigten Verfahren neue Wege zur Verfeinerung und Vertiefung der Erforschung des Bakterienlebens an sich und der von Bakterien und Hefen beeinflussten Vorgänge.