

121
b

Ueber Agar-Agarkulturen einiger Algen und Amöben.

Von
Dr. med. N. Tschutkin
in
Brest-Litowsk.

Angeichts der großen Bedeutung, welche die Reinkulturen nicht nur für die Bakteriologie und andere Teile der Parasitologie haben, dürfte es nicht ohne Interesse sein, wenn ich über die Erfolge berichten dürfte, die ich bei meinen Versuchen mit Kulturen einiger Algen erzielt habe.

Mein Interesse war auf den Polymorphismus der Bakterien und

deren Stellung im organischen Reiche gerichtet — Fragen, die bisher von verschiedenen Autoren verschieden beantwortet wurden, — und ich meiste mich der Lösung der Aufgabe zu nähern, indem ich vergleichende morphologische Beobachtungen der Bakterien und der ihnen in vieler Hinsicht ähnlichen Oscillariaceen anstellte. Dabei war ich natürlich genötigt, zunächst ein Mittel zu finden, die Oscillariaceen in Reinkultur zu erhalten.

So viel mir bekannt ist, war Beijerinck¹⁾ der erste, der Versuche gemacht hat, Algen in Reinkultur zu züchten. Im Jahre 1889 gelang es ihm, in einer 10-proz. Gelatineslösung in Grabwasser *Scolecodesmus acutus*, *Chlorella vulgaris* und *Chlorella limicola* vollständig zu isolieren und außerdem noch die Beziehungen jedes dieser Organismen zu verschiedenen Nahrungsstoffen festzustellen. Letztere bereitete er vor, indem er zu 8-proz. Gelatineslösung in gewöhnlichem Wasser folgende Stoffe hinzufügte: 1) Gelatine, vorläufig mit Pankreaspulver, stickstoffsaurem Ammonium und phosphorsaurem Kali bearbeitet, und 2) verschiedene Quantitäten trockenen Peptons, Asparagins, Rohrzuckers u. s. w.

Alle bekannten Algen wuchsen in künstlichen Nährstofflösungen gut und nur *Chlorella limicola*, die sich auf Gelatine so üppig entwickelte, „als ob sie eine gewöhnliche Bakterie wäre“, verdankte die Gelatine im Verlauf von einigen Monaten. Dieser Alge ergab auf Gelatine eine Ummasse von Zoosporen, jedoch wurde eine Kopulation derselben nicht beobachtet.

Beim Besehen der Oberfläche von Malsgelatine mit Partikeln der Flechte *Physcia parietina*, in sterilisiertem Wasser gewaschen, gelang es dem Autor, auch die Alge von Pilz abzusondern, dafür mißlang ihm der Versuch, die Flechte künstlich hervorzuferen.

Nach Beijerinck erhielt Wilhelm Kröger²⁾ im August 1892 in Gelatineschalen Kulturen, welche mit dem Materiale eines Saftfusses der Silberpappel (*Populus alba*) angesetzt waren, zweifelhafte Keimlinge; das eine vollständig grün, wie Chlorophyll, die andere gelblich-grün. Die eine dieser Algen erwies sich bei näherer Untersuchung als zur Gattung *Chlorella* gehörig und wurde von Autor *Chlorella protothecoides* benannt, die zweite Alge erachtete er als vollkommen neu und gab ihr den Namen *Chlorothecium saccharophilum*.

Bei meinen Untersuchungen versuchte ich es anfänglich, gleich Beijerinck, reine Algenkulturen mit Hilfe von Gelatinesubstraten zu erhalten. Jedoch mußte ich mich gleich bei den ersten Versuchen überzeugen, daß dieselben für den vorerwähnten Zweck untauglich seien. Algenkulturen auf Gelatine gelangen nämlich nur in dem Falle, wenn man das Versuchsmaterial aus einer Quelle beziehen kann — wie es auch bei Beijerinck war — in der sich die für die Kultur bestimmte Alge an und für sich in sehr großen Quantitäten befindet und dank ihrer Ueberzahl alle anderen Organismen ausschaltet.

1) Beijerinck, Kulturversuche mit Zoocysten, Liebigsalzen und anderen anderen Algen. (Bot. Zeitung, 1889, No. 45—48.)

2) W. Kröger, Ueber zwei aus Südkorea gebrachte Algen. (Exp. Bot. u. Physiologie niedriger Organismen, 4. Heft, 1894.)

unterdrückt. Wenn man aber, so wie ich, genötigt ist, Saaten aus eigener Material zu machen, das aus verschiedenen Organismen besteht, unter denen auch Bakterien in gebührender Quantitäten vertreten sind, so verflüssigt sich die Gelatine sehr schnell. Diese Verflüssigung vorbeizutreten sich allmählich über die ganze Kultur, wobei eine Unterdrückung der Algen durch stark entwickelte Bakterien erfolgt. Nach einigen solchen mißglückten Versuchen, Gelatineschalenkulturen zu erhalten, sah ich mich genötigt, eine andere Nährsubstanz zu suchen, und wählte dazu Agar-Agar.

Bei Wahl der Nährsubstanz strebte ich möglichst danach, ein Nährsubstrat zusammenzusetzen, das den natürlichen Medien der Algen am meisten entspräche. Da ich meinen Untersuchungen zur Selbstreinigung unterwarf — Algen aus dem Teich im Botanischen Garten der Kaiserlichen medizinischen Akademie und aus der Neva — so wählte ich denn auch eine 1-proz. Agarlösung in gewöhnlichem Wasser ohne jegliche Beigabe.

Die Zubereitung der Nährsubstanz war folgende: Auf eine bestimmte Quantität Wasser nahm ich in 1-proz. Verhältnisse Agar-Agar von der besten Sorte (in Büschchen) und ließ ihn sich im Verlauf von 10 Minuten bei Druck von 2 Atmosphären in Autoklaven lösen. Darauf filtrierte ich die Lösung durch einen Papierfilter (aus Rjasanzew'schem Papier) in einen gewöhnlichen Trichter. Nach Verteilung der Lösung auf Eprovetten sterilisierte ich sie wieder im selben Autoklaven in der Dauer von 15 Minuten und bei Druck von einer Atmosphäre. Nach Abkühlung der Lösung erhielt ich eine farblose, vollkommen durchsichtige, feste Substanz, die dem Wachs von der Mehrzahl der Bakterien sehr wenig günstig war. Ausgesät wurden die Algen erst dann, nachdem die Phiole mit der Agarlösung, der Kontrolle wegen, einige Tage im Thermostaten verbracht hatten.

Ueber die Art, wie die Aussaaten gemacht wurden, brauche ich meiner Meinung nach nicht auszusprechen, da es nach allgemeinen Regeln der Bakteriologie geschieht. Ich bemerke nur, daß die Fadenalgen, vorläufig in sterilen Wasser abgespült, mit steriler Scheere zerschnittet und in einer besonderen Phiole mit sterilem Wasser durchgeschüttelt wurden. Von hier aus wurden dann die einzelnen Tropfen der Mischung auf verdünnten und bis zu 40° abgekühlten Agar übertragen.

Bei Zubereitung von Kulturen nach Petri'scher Methode wandte ich gewöhnlich nicht weniger als 5—4 Verdünnungen in sterilem Wasser an. Der Inhalt jeder einzelnen Eprovette wurde durch Hin- und Herrollen zwischen beiden Handflächen stark durchgerührt. In allen anderen Fällen wurden die Saaten auf die beschriebene Weise durch einfaches Übertragen einer verschiedenen Anzahl von Tropfen, welche bald diese, bald jene Algen erhielten, gemacht. Für die Saaten benutzte ich stets doppelte Petri'sche Schalen.

Nach Erstarren des Agars wurden die Schalen auf einem Fensterbrett oder auf einem Tische in der Nähe eines hellen Fensters überstehend placiert; unter die Schalen wurde eine Glasplatte mit untergezeichnetem weißen Papier gelegt, und von oben wurden sie mit

einer Glaskuppel bedeckt. Auf die dem Fenster gegenüberliegende Seite der Kuppel wurde ein Stück näßig in Wasser benetztes Filtrierpapier geklebt. Zwischen Kuppel und Glasplatte ließ ich einen geräumigen Raum, um den Luftwechsel innerhalb der also konstruierten Feuchtkammer zu sichern. Von Zeit zu Zeit wurde das Papier von unten befeuchtet, um das Eintrocknen der Kulturen zu verhindern.

Bei Beobachtung der auf diese Weise zubereiteten Kulturen konnte man schon nach einigen Tagen in mehreren Schalen — später in allen — das Auftreten grüner Punkte bemerken, die von Tag zu Tag immer grössere Dimensionen annahmen und schließlich verschiedene Arten von Kolonien bildeten.

Nachdem ich mich von der Reinheit dieser Kolonien überzeugt hatte, mochte ich Abimpfungen kleiner Teile derselben auf die Oberfläche von sehrg erstarreten Wasseragar oder einfach in sterilisiertes Fließwasser, und indem ich die Kulturen unter den oben beschriebenen Bedingungen in Feuchtkammern konservierte, erhielt ich die Entwicklung vieler Algen mit den jeder von ihnen eigenen Kennzeichen.

Auf detailliertes Beschreiben der von mir erhaltenen Kulturen gehe ich nicht ein — erstens, weil eine Lösung der Frage, aus welchen Algen eine Kolonie gebildet sei, selbst bei mikroskopischer Untersuchung und zwar bei geringer Vergrößerung möglich ist, zweitens aber, weil diese meine Notiz das einzige Ziel hat, die Aufmerksamkeit der Gehörtenwelt auf die von mir angelegte Frage zu lenken und Personen, die unter besseren Verhältnissen als ich arbeiten können, zum Herausretten auf das weite Feld der Untersuchungen, das sich dank der Möglichkeit, Algen in reinen Kulturen auf festen und flüssigen Nährsubstraten zu erhalten, eröffnet, aufzufordern. Ich stelle nur das Ergebnis fest, daß 1-proz. Agarwasserlösung sich als sehr tauglich für den Wuchs und die Vermehrung der verschiedensten Algen erwiesen hat. Letztere der Agarkulturen entzogen, unterschieden sich, dem äußeren Aussehen nach, in nichts von Algen, die im Fluß oder Teich frei gewachsen waren.

Besonders stark hatten sich die Algen vermehrt, die den Palmellaceae, Dukmidieae und Diatomaceae zugehörig; auch die Fadenalgen hatten in den Kulturen ziemlich starke Kolonien gebildet. In den Kulturen von Oedogonium gelang es mir sogar, Bildung von Zoosporen und deren Ausstraten aus den Algenfäden zu beobachten; ihr weiteres Wachstum habe ich aber nicht beobachtet.

Die von mir in reinen Kulturen gezogenen Algen gehörten zu folgenden Gattungen: *Oscillatoria*, *Tetraplotheix*, *Aphanocapsa*, *Anacyctis*, *Diatoma*, *Nitzschia*, *Navicula*, *Gomphonema*, *Pleurococcus*, *Rhaphidium*, *Cosmoecidium*, *Protococcus*, *Scenedesman*, *Pentium*, *Glosterium*, *Cosmarium*, *Oedogonium*, *Stigeoclonium* und andere nicht sicher bestimmten.

Die von mir zu Algenkulturen angewendete Nährsubstanz hat sich auch für die Vermehrung einiger Amöben als sehr dienlich erwiesen. Letztere wachsen ausschließlich auf der Oberfläche von

Agar heran und nach Verlauf einer gewissen Zeit gingen sie in Ruhestand über (wurden angelockert und umgeben sich mit einer dicken Hülle). Auf frischen Agar übertragen, geben sie neue Kulturen.

Trotz wiederholter Versuche und verschiedener Modifikationen bei der Aussaat ist es mir nicht gelungen, diese Organismen ganz von Bakterien abzusondern; als störender Begleiter ist Kammerd erwies sich in allen Kulturen eine besondere Art Bacillen. Angesichts dieses Umstandes steigt unwillkürlich der Gedanke auf, daß zwischen Amöben und einigen Bakterien gewisse engere Beziehungen existieren müssen. So weit mir bekannt ist, ändern sich im selben Sinne auch andere Autoren, die mit Kulturen von Amöben zu thun gehabt haben (A. Celli und Ficrea, Beijerinck, Schardinger).

Dem neueren Beobachtungen Beijerinck's¹⁾ nach waren Wachs und Vermehrung der von ihm auf festem Substraten angesäuertes Amöben von einer größeren oder geringeren Zahl Bakterienkolonien oder von Hefen, die den Amöben als Nahrung dienten, unmittelbar abhängig. Um eine aus Gärmasse ausgespünte Amöbea autrophila zu kultivieren, benutzte der Autor filtrirte Agar-Agarlösung in destillirtem Wasser. Vorher entzog er dem Agar alle löslichen organischen Stoffe, indem er ihn im Verlauf von 14 Tagen in sterilen Wasser spülte. Darauf setzte er ihm 0,2 Proz. Phosphorsalz ($\text{NH}_4\text{NaHPO}_4 + 4\text{H}_2\text{O}$) und 0,05 Proz. Chlorkalium hinzu. Kulturen einer anderen Amöbe — Amöbea zymophila — gärenden Weizenbrennens entzogen — erhielt er auf Malzgelatine.

Die Kulturen dieser Amöbe erwiesen sich als höchst interessant auch noch in der Hinsicht, daß es an ihnen die Existenz sehr enger Beziehungen zwischen Amöbea zymophila, Saccharomyces apiculatus und den Essigbakterien zu konstatieren gelang.

Beijerinck's Anweisungen sind in letzter Zeit von C. Gorini²⁾ bestätigt worden, dem es gelungen ist, die Amöbea zymophila mit Saccharomyces apiculatus zusammen auf verschiedenen Kartoffelsorten zu kultivieren.

A. Celli und R. Ficrea³⁾ waren die Ersten, die in der Litteratur Meldungen über künstliche Kultur verschiedener Amöben gemacht hatten; sie erhielten in Kulturen auf 5-proz. Wasserlösung des Fucus erispus mit oder ohne Zugabe von Bouillon, auf sterilisirten Kartoffeln, auf Ascitesflüssigkeit und auf Eikweiß die Amöbea guttata, oblonga, madalana, coli, spinosa, diaphana, vermicularis und arborescens⁴⁾.

Identische Resultate meldete späterhin Casper Miller⁵⁾, der

1) Beijerinck, Bakterienreihe mit Amöben auf festem Substratum. (Centrbl. f. Bakteriologie etc. Bd. XIX. 1893. No. 3.)

2) C. Gorini, Die Kultur der Amöben auf festem Substratum. (Centrbl. f. Bakteriologie etc. Bd. XIX. 1906. No. 20.)

3) A. Celli und R. Ficrea, Centrbl. f. Bakteriologie etc. Bd. XV. 1888. No. 13/14 und Bd. XVI. 1891. p. 329.

4) Siehe auch meine kurze Notiz über meine Amöbenkulturen im „Wustsch.“ 1894. No. 38. Ref. No. 922.

5) A. C. Miller, Ueber künstliche Protozoenkulturen und die dazu verwendeten Methoden. (Centrbl. f. Bakteriologie etc. Bd. XVI. 1894. No. 7.)

Amöben und Plasmodien studierte. Als Nährsubstrate benutzte er: Hanfaufguß, neutrale Bouillon (2—4 Teile auf 100 Teile Wasser) mit $\frac{1}{2}$ Proz. Glycerin und einem kleinen Stückchen Schme, verdünntes Hensungut mit $\frac{1}{2}$ Proz. Trauben- oder $\frac{1}{2}$ Proz. Milchzucker.

Franz Schardinger¹⁾ hat mit Hilfe von Stroh- oder Heuagar zwei Amöben aus Kasanjancho und dem flüssigen Exkrementen eines fiebernden Typhuskranken aussondert. Eine, dem Kanalwasser entzogene, gesellt er den Monadinac.xoosporeae zu und sieht sie als der Protomonas Spirogyrae Berd. nahestehend an; dahingegen stellt er die andere der Amöba coli gleich.

November 1896.

1) F. Schardinger, Kalkulturen von Protomonen auf festen Nährböden. (Centralblatt f. Bakteriologie etc. 24, XIX, 1896, No. 14/15.)

НЕ ХИММУ

Stobny
abau