

Nachdruck verboten.

Übersetzungsrecht vorbehalten.

Aus dem Georg-Speyer-Haus, Frankfurt a. M.
(Direktor: Geheimrat Prof. W. KOLLE.)

Weitere Mitteilungen über gereinigte Amöben- und Ciliatenzucht.

Von
Dr. Rud. Oehler.

In früheren Mitteilungen¹⁾ habe ich dargetan, daß freilebende Protozoen, als Amöben, Flagellaten und Ciliaten, von den Bakterien ihrer Umwelt getrennt und in gereinigten Zuchten gehalten werden können. Der Grad der Reinigung war ein verschiedener. Es waren manche Arten nur in zweigliedriger Reinzucht erhältlich, d. h. die Zucht bestand aus einem reingezüchteten Bakterium als Nährunterlage und einem zugegebenen, ab Einzellenübertragung gewonnenen Stamm eines Zuchtprotozoen. Es war in manchen Fällen möglich, das nährnde Zusatzbakterium austauschbar zu machen, so daß beliebige Bakterien oder Hefen oder Einzellalgen der Zucht als Nahrungsspender untergeschoben werden konnten, wobei sich dann ergab, daß der Nährwert der Bakterien ein merklich verschiedener ist. Grampositive Bakterien nähren besser als gramnegative; säurefeste sind für manche Zuchtprotozoen gänzlich unverdaulich und damit als nährnde Unterlage unverwendbar. Bei manchen Amöben und Kleinflagellaten konnte auch die Zucht auf hitzeabgetöteten Bakterien erreicht werden; andere Formen versagten. Von Ciliaten

¹⁾ OEHLER, Amöbenzucht auf reinem Boden. Arch. f. Protistenk. Bd. 37 1916 p. 175—190. Derselbe: Gereinigte Ciliatenzucht. Arch. f. Protistenk. Bd. 40, 1919 p. 16 u. 41 1920 p. 34.

konnte nur die Art: *Colpoda Steini* in Sterilzucht, also frei von lebenden Bakterien erhalten werden. Diese Zuchten von *Colpoda Steini* und den anderen waren nicht nur mit durch Hitze abgetöteten Bakterien und Hefen, sondern auch mit fein vermahlenem Fleisch, mit Eiweißpulver, mit zerriebenem Spinat, also mit Zelltrümmern, ernährbar und unbegrenzt fortzuchtbar. Dagegen erwiesen sich klare Eiweiß- und Peptonlösungen, Bouillon und sonstige ungekörnte Nahrung als ungeeignet, die Zucht der genannten Protozoen fortzuführen.

Ich habe mich seitdem bemüht, weitere derartige gereinigte und steril fortführbare Zuchten zu gewinnen. Zuerst bei großen Ciliaten; dann, als nur wenig Erfolg kommen wollte, bei mittelgroßen und größeren Amöben. Und ich war bemüht, die physiologische Verwendbarkeit der gewonnenen Zuchten weiter auszubauen. Über das bisher Erreichte soll hier berichtet werden.

Man hat mir gesagt, diese gereinigten Protozoenzuchten bieten dem Morphologen keinen Vorteil. Das mag für die Morphologie der gangbaren Kern- und Zellteilung der Fall sein. Für die feinere experimentelle Morphologie und Biologie der Zelle und ihrer Teile aber kann ich das nicht zugeben. Wenn Reizungen, Hemmungen, Störungen der Zellteile verfolgt werden sollen, müssen die Züchtungslagen genau bekannt und rein, d. h. übersichtlich und beherrschbar sein; denn jede Unklarheit im Züchtungsansatz trübt den Versuch. Ich bin der Ansicht, daß wir keine feinere Amöben- und Ciliaten-Physiologie und Toxikologie haben, solange es an einer gangbaren gereinigten Zucht dieser Einzeller fehlt. Und ich erwarte von der erreichten Rein- und Sterilzucht dieser Zellsorten verwendbare Einsichten in deren Feingetriebe. Es gilt 1. die gereinigten Zuchten sicher, bequem und vielfach zur Ausführung zu bringen und 2. die so gewonnenen Zuchten experimentell fruchtbar zu verwenden. Beides habe ich versucht. Ich habe das große Glück gehabt, erst im hygienischen Institut bei Geh.-Rat NEISSER, dann bei Geh.-Rat KOLLE im Georg Speyer-Haus Arbeitsstellen zu finden, wo ich ohne Hemmung und ohne Bedrängnis in stiller Arbeit diese Aufgaben verfolgen konnte. Ich habe meine Röhrchen bearbeitet, während 70 Meter vom Arbeitsplatz eine Fliegerbombe in die Maschinenhalle des Krankenhauses einschlug und während man draußen die knatternden Maschinengewehre der roten Revolution hörte; und ich fand, als zu Zeiten des tiefsten Markverfalls alle Geräte zu unnennbaren Teuerungswerten heraufschnellten, doch meine Arbeitsstelle bereit und beschickt. Was ich heute an Ergebnissen mitteile, halte ich

nur für Andeutungen von dem, was noch erreicht werden kann. Ich möchte zeigen, daß hier gearbeitet werden kann, und mein Wunsch ist, daß Andere die Arbeit aufnehmen und fortsetzen.

Die Mittel und Wege, welche zur Reinigung der Protozoen von den Begleitbakterien führen, seien eingeteilt in 1. mechanische, 2. physikalisch-chemische, 3. biologische.

1. Mechanische Verfahren sind die Waschung, das Abschleudern, das Plattengußverfahren. Ich habe viel Versuche damit gemacht und nichts erreicht. Und doch hoffe ich immer noch auf mechanische Verfahren, um die im Wasser schwebenden Protozoen von unerwünschten Begleitern zu reinigen. Versuche mit schleimigen Medien, mit der Zentrifuge, Waschungen über einem Filter sind immer von neuem aufzunehmen: einst kann doch noch ein bequemer und sicherer Erfolg kommen. Leider kann ich selber solchen bis heute nicht berichten. Neuerdings wieder habe ich die Waschung von Paramäcien auf dem Filter versucht. Ein Glasrohr, 1—2 cm Durchmesser, etwa 10 cm hoch, am einen Ende ausgezogen, so daß es in einen durchbohrten Gummistopfen eingesetzt werden kann, wird am verjüngten Ende mit Watte und Fließpapier mäßig fest verstopft und dann im Dampftopf sterilisiert. Ein steriler Deckaufsatz kommt auf das weite Ende. Das verjüngte Ende wird mit dem Gummistopfen auf eine Saugflasche aufgesetzt, die an eine Luftpumpe angeschlossen ist. Paramäcien werden mit der Saugpipette eingeführt und dann, während die Saugpumpe Tropfen um Tropfen das Wasser aus dem Filterrohr abzieht, wird mit steriler Pipette oben steriles Wasser zugegeben. Die Waschung arbeitet gut. Nach Verbrauch von 40—50 ccm Wasser können oben schon Wasserproben abgenommen werden, die zum Teil steril sind. Aber die Paramäcien sind weniger und weniger geworden. Sie haben sich im Filterboden verfangen, und was allenfalls abgehoben werden kann, ist nicht steril. So wenigstens in meinen bisherigen Versuchen. Man sieht die Schwierigkeit, sieht aber auch, daß mit viel Geduld und nach zahllosen Versuchen so doch vielleicht ein bakterienfreies Paramäcium zu erreichen ist. Wie es dann zu ernähren und steril weiterzuzüchten ist, das allerdings ist eine weitere Frage. Von R. A. PETERS¹⁾ ist die Mitteilung ausgegeben worden, daß es ihm gelungen sei, *Paramaecium* und *Colpidium colpoda* durch wiederholte

¹⁾ R. A. PETERS, Nutrition of Protozoa: the growth of paramaecium in sterile culture medium. Journal of Physiology Bd. 53 Nr. 6 p. 108. — Derselbe, The substances needed for the growth of a pure culture of Colpidium colpoda, Ebenda Bd. 55 1921 Nr. 1 u. 2 p. 1 u. 32.

Waschung von den Begleitbakterien zu trennen und in sterilen Nährlösungen weiter zu züchten. Diese Aussagen widersprechen meinen Erfahrungen auf das bestimmteste. Ich habe mich darüber ¹⁾ bereits kurz geäußert und kann nur wiederholen, daß ich, solange die PETERS'schen Zuchten nicht von anderer Seite genügend und ausgiebig nachgeprüft sind, deren Bakterieneinheit nicht anerkennen kann. Denn das, was PETERS an Sterilitätsproben berichtet, ist für diese feinen und schwer übersehbaren Versuche durchaus ungenügend. Es wird später bei der Frage der Sterilitätsprobe nochmals auf diese Frage zurückgegriffen und sei somit auf das dort Gesagte hingewiesen. Hier gilt die Aufstellung: mir sind Waschungsversuche bei Ciliaten nicht bis zur vollkommenen Bakterienfreiheit gediehen und an die PETERS'schen Erfolge kann ich vorerst nicht glauben.

2. Physikalisch-chemische Verfahren sind besonders verwendbar bei Cystenbildnern. FROSCHE, ²⁾ der Vater der Amöbenzüchtung, ist schon so vorgegangen, indem er die Amöben tagelang mit Soda-lösung behandelte, dann die Cystenerweckung betrieb. Er berichtet von erreichten Sterilzuchten, doch wurde nicht weiter damit gearbeitet. Für Darmamöben ist das Verfahren neuerdings zur Verwendung gekommen, wie berichtet wird, mit gutem Erfolg.³⁾ Doch haben diese Zuchten die allgemeine Nachprüfung in anderen Instituten noch nicht bestanden.

Bei Ciliaten, besonders bei *Colpoda cucullus* und *Colpoda Steini* habe ich versucht, die Begleitbakterien der Cysten durch Chemikalien oder durch Hitze abzutöten. Säuren, Alkali, Metallsalze, desinfizierende Stoffe wurden versucht; doch kann ich von keinem Erfolg berichten. Durch trockene Hitzebehandlung hingegen gelang es mir, Cysten von *Colpoda cucullus* und *Colpoda Steini* von den Begleitbakterien zu befreien und eine zweigliedrige Reinzucht von

¹⁾ Wirkung von Bakteriengiften auf Ciliaten. Nachtrag. Centralbl. f. Bakt. Orig. Bd. 87, 1922 p. 302.

²⁾ P. FROSCHE: Zur Frage der Reinzüchtung der Amöben. Ebenda (Orig.) Bd. 21 1897 p. 926.

³⁾ K. YOSHIDA: Reproduction in vitro of Entamoeba tetragena and Entamoeba coli from their cysts. Journ. exp. med. Bd. 32, 1920 p. 358.

MARG. HETZER: Studien über Protozoen insbesondere des Darms. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Bd. 77, 1914 p. 304.

A. WILLIAMS: Pure culture of amoeba parasitic in mammals. Journ. med. research Bd. 25, 1911—1913 p. 263.

M. COURET u. M. J. WALKER: The cultivation of Amoeba in pure culture upon autolyzed tissues. Journ. exp. med. Bd. 18, 1913 p. 257.

Colpoda cucullus + *Saccharomyces exiguus* zu gewinnen. Die trockenen Röhrcn mit den Cysten von *Colpoda cucullus* waren 6 Wochen bei 37° im Brutschrank. Mit Wasser + *Saccharomyces exiguus* beschickt, schlüpfen nach 2 Tagen die *Colpoda cucullus*-Ciliaten aus und konnten mit *Saccharomyces exiguus* weiter geführt werden. Bakteriologische Proben ergaben nur *Saccharomyces exiguus*, keine andere Begleitbakterien.

Die Cysten von *Colpoda cucullus* vertragen trockene Hitze von 60—64° 24 Stunden ganz gut. Die Hefen dagegen nicht. Soll der *Colpoda cucullus*-Zucht eine andere Zuchtunterlage untergeschoben werden, so wird das Röhrcn mit Cysten für 24 Stunden bei 60° im Wärmeschrank gehalten, dann mit Wasser + der gewünschten Bakterienart beschickt. Die auskommenden Ciliaten sind hefefrei und rein mit dem Zusatzbakterium abnehmbar. Neuerdings ist es mir gelungen, die gereinigten und erweckten Cysten von *Colpoda cucullus* mit abgekochtem Spinatbrei und Serum starr zu füttern und steril weiter zu züchten. Über die anschließenden Fütterungsversuche wird später berichtet. Bei anderen cystenbildenden Ciliaten habe ich entsprechende Versuche gemacht, bisher aber ohne Erfolg. Weitere gereinigte Zuchten konnte ich bisher aus Cysten nicht erzielen.

3. Zu den biologischen Verfahren rechne ich die Reinigung durch Zellwanderung, sei's auf der Agarplatte, sei's im Ogatasteigrohr, sei's im U-Rohr mit elektrischer Durchströmung. Eine biologische Reinigung findet auch statt bei Einverleibung in den Tierkörper, ein Verfahren, dem aber nur parasitische Protozoen standhalten. Dagegen kann ein gemischter Zuchtansatz, der ein Protozoon und mehrere Bakterienarten enthält, gereinigt und zu einem monobakteriellen Ansatz überführt werden, wenn durch Zugabe zersetzlicher Stoffe eine Gärung ausgelöst wird. Ich konnte eine mit Wasserbakterien beladene Zucht von *Colpidium campylum* durch Zusatz von Heubacillus und Peptonlösung von sämtlichen Wasserbakterien reinigen, so daß eine saubere zweigliedrige Zucht von *Colpidium* und Heubacillus erreicht wurde. Die Zucht *Colpidium campylum* + Heubacillus läßt sich durch Überführung in $\frac{1}{100}$ Traubenzucker + *Saccharomyces exiguus* vom Heubacillus reinigen. Die Hefe ihrerseits verliert sich, wenn man auf Wasser und irgendeine verdauliche Bakterienart über mehrere Folgeröhrcn fortimpft. So läßt sich dem *Colpidium campylum* ein beliebiges Bakterium in gereinigter Zucht zuführen. Es ist das eine Reinigung durch Überwucherungsansätze. Ich habe mit anderen Ciliaten dasselbe

Verfahren versucht, aber ohne Erfolg. Entweder die Ciliaten gingen im Ansatz von Peptonlösung + Heubacillus zugrunde, oder die Wasserbakterien überstanden die Heubacillengärung und blieben unverändert dem Zuchtansatz beigemischt. Die Reinigung im Steigrohr für Bakterien und für Wasserflagellaten, von OGATA beschrieben, ist eine Wanderung der Protozoen nach dem Sauerstoff zu. Im feinen Glasrohr häufen sich manche Bakterien und Wasserprotozoen 1—5 mm unter der Oberfläche in äußerst dichten Mengen an. So findet eine Anreicherung und relative Reinigung statt, welche wiederholt und gesteigert werden kann. Ich konnte eine Reinzucht von *Polytoma wella* durch dieses Hilfsmittel erreichen. Nicht, daß das Steigrohr allein schon die volle Reinigung erzielt hätte. Aber, was vom Steigrohr abgehoben wurde, war so arm an Begleitbakterien, daß, auf der Bouillonagarplatte ausgestrichen, dann einzelne Kolonien von *Polytoma* aufgingen, von denen die Reinzucht abgenommen werden konnte.

Durch Wanderung zum Licht und zur Oberfläche lassen sich im Steigrohr sehr wohl noch weitere Arten der Reinigung nähern. Ich selber kann nur über den einen Erfolg bei *Polytoma* berichten.

Die Wanderung der Ciliaten unter dem Richtungstrieb des elektrischen Stroms ist eine physiologische Erscheinung, keine rein physikalische Kataphorese. Darum rechne ich die Versuche, durch diese Mittel eine Reinigung von den Begleitbakterien zu erzielen, auch zu den physiologischen Mitteln. Ich habe sie bei *Paramecium* versucht, aber nichts erreicht. Glücklichere Erfolge berichtet AMSTER-Göttingen. Er verwendet ¹⁾ den MICHAELIS'schen Kataphoresenapparat mit unpolarisierbaren Elektroden in 0,65/100 Kochsalzlösung. Die Ciliaten sammeln sich an der Kathode und werden hier abgenommen. Das Verfahren muß 6 mal wiederholt werden, bis Reinigung eintritt. AMSTER hat das Schicksal der gereinigten Ciliaten nicht weiter verfolgt. Er benutzt sie nur, um eine Reinzucht von Bakterien zuzugeben und mit dieser die Zucht fortzuführen. Herr Prof. REICHENBACH in Göttingen war so gütig, mir einen Ableger der von AMSTER nach elektrischer Waschungsreinigung gewonnene monobakteriellen Ciliatenzucht zu übersenden. Der Ciliat ist ein *Balantiophorus* (nicht *B. minutus*, aber diesem ähnlich). Das begleitende Nährbakterium ist ein *Bact. fluorescens*.

¹⁾ 9. Tagung d. deutsch. Vereinigung für Mikrobiologie, Würzburg 1922 Centralbl. f. Bakt. (Orig.) Bd. 89 1922 p. 167: Ein neues Züchtungsverfahren für Protozoen.

Der Ciliat ist sehr widerstandsfähig gegen die jauchigen Zersetzungsstoffe von Eiweiß und Peptonlösungen und darum in solchen Lösungen lang haltbar und leicht fortzuchtbar. Das *Bact. fluorescens* ist ein solches, wie es in allen faulenden und jauchenden Stinkwässern als gemeinstes und aufdringlichstes Bakterium vorkommt. Jeder Reinigungsversuch von Ciliaten aus solchen Wässern scheidert erfahrungsgemäß an der Unverdrängbarkeit des *Bact. fluorescens*. Alle anderen, aus dem Schmutzwasser stammenden Bakterien lassen sich vertreiben; nur dieses *Bact. fluorescens* nicht. Es bleibt bei den betreffenden Ciliaten und läßt sich durch nichts absondern. Darum ist es leicht, es als einziges Begleitbakterium jedem aus einem Schmutzwasser stammenden Ciliaten zuzuführen. Man braucht nur reines Wasser mit einem Vorrat von *Bact. fluorescens* zu versehen und dieses mit den Ciliaten zu beimpfen. Solche Beschickung über 2—3 Folgeröhrchen fortgesetzt führt zu einer reinen zweigliedrigen Zucht des Ciliaten + *Bact. fluorescens*. Die anderen Begleitbakterien kommen gegen die Anreicherung mit *Bact. fluorescens* nicht auf, werden verdrängt und verschwinden aus der Zucht.

Anders, wenn man ein anderes, minder aufdringliches Bakterium einführen will, wo *Bact. fluorescens* bisher zugegen war. Man mag noch so große Mengen des anderen Bakteriums in Wasser einsäen und mag noch so viele Folgeröhrchen durchprobieren: das *Bact. fluorescens* wird nicht verdrängt, es bleibt und nährt sich von den Säften des eingesäten anderen Bakteriums. Dies beachtend muß man zu der von AMSTER gewonnenen zweigliedrigen Reinzucht *Balantiophorus* + *Bact. fluorescens* sagen: sie beweist nichts für die Reinigung durch elektrisch betriebene Waschung der Ciliaten. Was sie bringt, eine Zucht mit *Bact. fluorescens* als einzigem Begleitbakterium, kann auch durch fortgesetzte Anreicherung mit *Bact. fluorescens* erreicht werden. Daß die Ciliaten der AMSTER'schen *Balantiophorus*zucht jemals frei von *Bact. fluorescens* gewesen sind, kann daraus nicht abgenommen werden. Ja, wenn Dr. AMSTER neben dieser monobakteriellen Zucht mit *Bact. fluorescens* noch andere Zuchten mit anderen Bakterien als alleinigen Begleitern seines Ciliaten herausgebracht hätte, dann wäre offenbar, daß die elektrische Waschung etwas leistet, daß sie die Bakterien verdrängt, daß sie auch die so aufdringlichen und sonst unverdrängbaren Fluoreszenzbakterien von den Ciliaten trennt und erlaubt, den so gereinigten Bakterien beliebige andere Zusatzbakterien beizugeben. Solange das nicht vorliegt, kann über den Reinigungserfolg der AMSTER'schen elektrischen Waschung nichts gesagt werden. Viel-

leicht leistet sie etwas, vielleicht auch nicht. Genügende Proben liegen bis jetzt nicht vor.

Es wäre sehr wünschenswert, wenn die AMSTER'schen Versuche nochmals aufgenommen und mit erweiterter Prüfung durchgeführt würden. Das Göttinger Institut, das die Apparatur besitzt und das die Frage angegriffen hat, wäre wohl am berufensten hierzu. Ich selber habe den nötigen Apparat nicht zur Hand und bin anderwärts beschäftigt. Das AMSTER'sche Verfahren sollte herangezogen werden, um das Verhalten der gereinigten Ciliaten weiter zu prüfen. Es ist zu untersuchen, in welchen Lösungen, Schwebefällungen und Aufschwemmungen die so gereinigten Ciliaten steril weiter gezüchtet werden können, ohne zu verkommen. Das, was PETERS¹⁾ behauptet hat, und was ich bisher für unausführbar gefunden habe, die Ernährung von Ciliaten in klaren sterilen Lösungen, ist mit der AMSTER'schen Apparatur zur Entscheidung zu bringen. Ich verfüge, wie gesagt, zurzeit nicht über das nötige Gerät, auch nicht über die nötige Muße, um dem nachzugehen; möchte mich aber freuen, wenn Andere diese Untersuchungen aufnehmen wollten.

Alle diese Verfahren versprechen somit manchen Erfolg, haben auch mir hier und da etwas eingebracht, aber doch nicht so, daß damit das Plattenverfahren in Vergessenheit geraten könnte. Ich habe durch das Plattenverfahren 1916—1919 mehrere Amöben zur Sterilizucht gebracht. Ferner wurde durch das Plattenverfahren die Sterilizucht vom Ciliaten *Colpoda Steini* gewonnen, von der heute noch Folgeröhrchen auf Wasser + Spinat 100° weiter geführt werden. Die Zucht ist in mehreren anderen Instituten nachgeprüft und überall als steril begutachtet worden. Die knappen Ergebnisse der anderen Verfahren haben mich nur dazu geführt, die Zuchtreinigung mit dem Plattenverfahren, von dem ich ausgegangen war, wieder aufzunehmen. Ich habe darum die Versuche mit Ciliaten und Flagellaten zurückgestellt und habe mich den Amöben zugewendet, für welche das Plattenverfahren besonders geeignet ist.

Wenn man Amöben auf die Mitte einer mit $\frac{1}{100}$ Wasser-Agar beschickten Petrischale einsetzt, so reinigen sie sich von ihren Begleitbakterien, indem sie auf den Agar auswandern. Was rasch wandert und sich rasch vermehrt, hat Aussicht die Reinigung zu erreichen; was langsam wandert und sich schlecht vermehrt, bietet wenig Hoffnung. Man kann also bald wissen, ob ein Versuch fortzusetzen oder aufzugeben ist. Zunächst trachtete ich danach, die

¹⁾ Vgl. oben und Journ. of Physiol. Bd. 55 p. 1 u. 32.

rasch beweglichen Bakterien und allfällige Sporenbildner los zu werden. Ich versuchte die Überführung auf *Bacillus xerosis* oder *Saccharomyces exiguus*. Beide Sorten werden von den Amöben meist gern aufgenommen. Die Agarplatten in Petrischalen werden also mit einer kleinen Öse Reinkultur genannter Art beschickt, und die Masse wird mit dem Glasspatel oder einem Reagensrohrende auf der Agarfläche dünn ausgestrichen. Auf die Mitte der Platte kommt die Amöbenimpfung, und der Wettlauf zwischen Amöben und den mitgebrachten Wildbakterien beginnt. Manchmal sieht man bei 50facher Vergrößerung schon, wie weit der vom Impffleck ausgegangene Bakterienrasen reicht. Sind Amöben über den äußersten Saum des Bakterienrasens hinausgewandert, so werden sie zur Übertragung auf Folgeplatten verwendet. Mit dem Metallspatel kann man beliebig große oder kleine Agarschollen samt Amöben sauber ausstechen und auf neue Platte übertragen. Ebenso werden Probestücke entnommen und auf Bakterieneinheit färbend oder züchtend untersucht. Färbeproben werden mit der bewachsenen Seite auf Objektträger gelegt, hier ausgestrichen, die Stelle getrocknet und gefärbt. Oder der Agarblock kommt mit der unbewachsenen Seite auf den Objektträger, wird mit Riegel-Chloroform-Methylenblau oder mit Löffler-Methylenblau oder sonst einer Bakterienfarbe gefärbt, mit Deckglas belegt und unter der Immersion untersucht. Man sieht dann alsbald, ob neben den ausgestrichenen Hefen oder Xerosobazillen noch andere Fremdbakterien vorhanden sind oder nicht. Will man Züchtungsproben machen, so wird mit abgeglühtem Spatel ein Agarstück aus der Platte ausgestochen und auf Schrägagar in einem Röhrchen, mit der bewachsenen Seite nach unten, verrieben.

Bei manchen Amöben führen wenige Übertragungen auf Folgeplatten schon zum Ziel. Andere werden ihre Begleitbakterien nicht los. Dann hilft vielleicht eine Zwischenschaltung von *Vibrio METSCHNIKOFF* oder *Bact. coli* oder *Bact. fluorescens*: Sie halten dann manchmal die Wildbakterien zurück und setzen sich an deren Stelle.

Vibria METSCHNIKOFF kann leicht durch *B. xerosis* auf trockener Platte verdrängt werden; *B. coli* und *Bact. fluorescens* sind viel zäher. Wollen die Wildbakterien gar nicht weichen, so kann man versuchen, von ihnen einzelne Hauptvertreter rein zu züchten und diese auf der Platte auszustreichen. Es gibt dann immerhin eine monobakterielle Amöbenzucht, aber keine solche, deren Nährbakterium man leicht auswechseln kann. Denn das ist der Zweck der Xerosobazillen und der Hefen bei der Zuchtreinigung: die Amöbe soll auf

ein unbewegliches Nährmikrobion als einzigen Zuchtbegleiter übergeführt werden, weil von da aus leicht jedes andere gewünschte Bakterium der Zucht untergeschoben werden kann. Hat man die Zucht mit *B. xerosis* oder sonst einem unbeweglichen Mikroben, so kann man alsbald beliebige Bakterien, Hefen, Algen, Pilze, Diatomeen, Flagellaten usw. in Reinkultur auf die Platte ausstreichen und die Platte in der Mitte mit der Zuchtamöbe + *B. xerosis* beschicken: es weist sich dann aus, ob die gebotene Nahrung den Amöben zusagt oder nicht. Geht die Platte an, wandern die Amöben aus und vermehren sie sich auf der Platte, dann ist die gebotene Nahrung gedeihlich. Bleibt das Wachstum kümmerlich oder fehlt es ganz, dann ist die Nahrung ungedeihlich. Immer saubere, Arbeit und unablässige Nachprüfung durch Farbe und Zuchtproben vorausgesetzt.

Das Ziel der Zuchtreinigung geht noch weiter. Nicht allein monobakterielle Amöbenzucht soll erreicht werden, sondern, wenn möglich die bakterienfreie Zucht, die Sterilzucht.

Zu dem Zwecke werden die Versuchsplatten mit abgetöteten Bakterien, mit sterilisiertem Fleischpulver, mit zermahlenem und gekochtem Spinat, mit sterilem Eiweißpulver, mit Blut, mit Hirnbrei, mit erstarrtem Serum u. dgl. beschickt. Gehen hier die Amöben an, so werden sie auf Schrägagarröhrchen übertragen und mit gleichem Nährmittel von Röhrchen weitergeführt. Nur was so im Röhrchen wächst und bei allen Zuchtproben sauber befunden wird, ist eine sicher geprüfte verlässliche gereinigte Zucht. Was die Platten ergeben, ist immer nur wahrscheinlich, nie gewiß. Zuchten auf Platten, in Petrischalen sind der Staubverunreinigung so sehr ausgesetzt, daß hier wohl Reinigung gewonnen, aber nicht sicher erhalten werden kann.

Zur Prüfung bediene ich mich vornehmlich der Schrägagarröhrchen, wenn möglich solcher, die etwas Kondenswasser enthalten. Der Agar, wie üblich, mit Bouillon und Pepton nahrhaft gemacht. Hierauf werden bei flüssigen Zuchtansätzen mit der Pasteurpipette Proben ab den zu untersuchenden Röhrchen zugegeben, und zwar nicht zu wenig: mindestens 0,5 ccm. Es genügt nicht, wie PETERS¹⁾ angibt, eine gute Öse voll zu nehmen. Bei den hier vorkommenden dünnwässrigen Ansätzen sind größere Probemengen nötig, um ein sicheres Bild vom Keimgehalt der Ansätze zu gewinnen. Die zur

¹⁾ PETERS, Journ. of Physiology Bd. 53 Nr. 6 p. 108 u. 55 (1921) Nr. 1 u. 2 p. 1 u. 32.

Probe beschickten Schrägagarröhrchen müssen, da sie bei Zimmertemperatur gehalten werden, wie auch die Zuchtröhrchen, welche sie prüfen sollen, mindestens 8 Tage lang beobachtet werden.¹⁾ Es ist zu bedenken, daß es im Wasser Bakterien gibt, die nicht in Kolonien wachsen, sondern in dünnem Flor den Nährboden überziehen, so daß solche leicht der Wahrnehmung entgehen. Abstriche auf den Objektträger müssen gemacht und nach Färbung unter dem Mikroskop geprüft werden. Außer der Probe auf Schrägagar sind auch solche mit Peptonlösung oder Bouillon zu machen. Auch hier Zusatz von großen Mengen Zuchtflüssigkeit. Oder umgekehrt: es kommt zum Inhalt eines Zuchtröhrchens ein guter Zusatz von 10 proz. Peptonlösung. Ist das Zuchtröhrchen nicht ganz bakterienfrei, dann vermehren sich die Verunreiniger in der so nahrhaft gemachten Lösung, trüben dieselbe, können auf Schrägagar leicht nachgewiesen werden und vor allem: die Ciliaten des Zuchtröhrchens verfallen der Vergiftung durch die Zersetzungsstoffe der Bakterien. Sterile Zuchtansätze von Ciliaten und Amöben können unbedenklich mit reichlich Peptonlösung versetzt werden, ohne Schaden zu leiden. Bakterienverunreinigte Zusätze dagegen nicht.

Ich mache es PETERS²⁾ zum ersten Vorwurf, daß er bei seinen angeblichen Sterilzuchten von *Colpidium colpoda* diese Probe unterlassen hat. Wenn seine Zuchten noch existieren, müssen sie von ihm und von anderen in solcher Weise nachgeprüft werden.

Handelt es sich bei der zu prüfenden Zucht nicht um eine Sterilzucht von Ciliaten, Flagellaten oder Amöben, sondern nur um eine zweigliedrige Reinzucht, bestehend aus einem reinen Protozoenstamm und einem ernährenden reinen Bakterienstamm, dann wachsen auf den Schrägagarröhrchen Bakterien, und diese werden mikroskopisch auf Reinheit geprüft. Fehlen Fremdbakterien, dann ist die Zucht sauber. Die gereinigte Amöbenzucht ist zugleich eine ernährungsphysiologische Prüfung der Amöben. Die Verdauungsleistung der Amöben wird an verschiedenen Bakterien, lebenden wie toten, an Hefen, Algen, an Zellen und Zelltrümmern verschiedener Art geprüft, und es zeigt sich, was verdaulich und ernährend ist, was nicht. Allgemein erweisen sich, entsprechend früher gemachten Erfahrungen, die gramnegativen Bakterien am leichtesten verdaulich. Sie geben das ausgiebigste Wachstum von Amöben auf der

¹⁾ Handelt es sich um Zuchtansätze mit Algen, dann ist entsprechend dem langsamen Wachstum dieser Zöglinge noch längere Beobachtungszeit geboten.

²⁾ Vgl. oben.

Platte. Grampositive Bakterien wie *B. xerosis*, Staphylococcen, Sarcinen sind nicht schlecht, geben gutes Amöbenwachstum, aber immerhin etwas langsamer, weniger reichlich als die gramnegativen Bakterien. Hefen, einzellige Grünalgen, Pilze von *Endomyces vernalis* nähren gut. Schlechte Nahrung sind die säurefesten Bacillen. Abgetötete Bakterien werden von manchen Kleinamöben angenommen. Hier kann die Sterilzucht auf bei 100° abgetöteten Kolibacillen erreicht werden. Andere Amöbenarten aber kommen auf den Platten mit abgetöteten Bakterien oder sonstiger steriler Ersatznahrung nicht recht zum Wachstum. Es wandern einige Amöben auf die Platte aus, vermehren sich auch langsam, aber all das genügt nicht, um die Zucht auf ein Schrägröhrchen von $\frac{1}{100}$ Wasser-Agar + *B. coli* 100° zu überführen und so eine gangbare Sterilzucht zu gewinnen. Statt der durch Siedehitze abgetöteten Bakterien kann auch zerriebener und durch Kochen sterilisierter Spinatbrei auf der Platte aufgetragen werden. Sehr bequem fand ich Blutserum bei 64—74° gallertig erstarrt, so daß es noch mit der Pipette aufgezogen werden kann. Ein Tropfen davon mit dem Glasspatel auf der Agarplatte ausgestrichen, gibt eine gute Beschickung mit steriler Ersatznahrung, die von manchen Amöben gern aufgenommen wird. Hat man eine Amöbenzucht rein mit einem unbeweglichen Microben, etwa *B. xerosis* oder Hefe oder *Endomyces*, so wird damit die Platte auf der Mitte beschickt. Wandern die Amöben aus, vermehren sie sich und sind keine Verunreiniger eingedrungen, dann ist die Sterilzucht auf Serum starr gewonnen. Sie kann in Schrägagarröhrchen + Serum starr weitergeführt werden. Bequemes und übersichtliches Verfahren.

Es wäre nun sehr erwünscht, hinsichtlich der sterilen Ersatznahrung, mit der die bakterienfreien Zuchten am Leben erhalten werden, eine ähnliche Stufenreihe aufzufinden, wie sie für gramnegative, grampositive und säurefeste Bakterien nachweisbar war. Das heißt eine Stufenreihe der sterilen Ersatznahrungsansätze nach ihrer Verdaulichkeit; also gut verdauliche, mittel verdauliche und schwer verdauliche. Die Gruppe der schwerverdaulichen ist gegeben in den durch Siedehitze abgetöteten Bakterien, Algen, Hefen und Zelltrümmern. Sie werden von der verdauungsstarken *Colpoda Steini* verdaut und dienen zur Erhaltung von deren Sterilzucht, sie werden nicht verdaut, werden als Ersatznahrung abgelehnt von *Colpidium campyllum*. *Colpoda cucullus* zeigt insofern ein schwankendes Verhalten, als die meisten Ciliaten dieser Art durch Siedehitze sterilisierte Ersatznahrung nicht annehmen, nur einzelne Stücke er-

weisen sich als besonders verdauungstüchtig und ermöglichen eine Sterilzucht mit Spinat 100° 1 Stunde. Auch von den Amöben lehnen viele die schwerverdaulichen hitzesterilisierten Bakterien und Zelltrümmer ab.

Es ist nun naheliegend, anders abgetötete Bakterien durchzuversuchen. Ich habe mich darum bemüht, aber bis jetzt nichts erreicht. Aceton tötet Colibacillen überhaupt nicht ab. Äther auch nur unsicher. Und die mit Äther abgetöteten Bakterien gaben, wenn wirklich alles steril war, bis jetzt keine besseren Ergebnisse als die hitzesterilisierten.

Eine leichtverdauliche sterile Ersatznahrung für bakterienfreie Amöben und Ciliatenzuchten fehlt mir noch. Es gilt, weiter zu suchen. Vielleicht liefern autolytische Macerationen von steril entnommenen Organen ein verwendbares Präparat. Meine Versuche darüber sind bei weitem nicht spruchreif. Ich habe abzentrifugierte rote Blutkörper und auskristallisierendes Hämoglobin versucht, ohne mehr damit zu erreichen, als mit Spinat $100^{\circ} \times 1$ Stunde. Blutserum steril entnommen oder durch Bakterienfilter steril gewonnen, wurde im Röhrchen erwärmt, bis gallertige Gerinnung eintrat. Es waren Temperaturen von $65-74^{\circ}$ notwendig. Die Serumgallerte läßt sich auf Agar austreichen und läßt sich verrieben und verteilt im Wasser aufschwemmen. Es ist eine bequeme und sehr verwendbare sterile Ersatznahrung für Sterilamöben und Sterilciliaten. Aber daß es leichter verdaulich wäre und weiter führte, als Spinat $100^{\circ} \times 1$ Stunde, konnte ich bis jetzt nicht finden. Auch Niederschläge von 1—2 Tropfen 5proz. Alaunlösung in 5 ccm 5proz. Peptonlösung habe ich versucht. Wird von *Colpoda Steini* angenommen, von *Colpoda cucullus* schlecht oder überhaupt nicht: ist also auch schwer verdaulich. Es bleibt vorerst dabei: die leichtverdauliche sterile Ersatznahrung für bakterienfreie Amöben und Ciliaten ist noch nicht gefunden. Und damit fehlt auch die gesuchte Stufenfolge von leichtverdaulichen zu schwerverdaulichen Stoffen.

Ist so die fortgesetzte Zuchtreinigung zugleich ein fortgesetzter ernährungsphysiologischer Versuch, so gilt es auch, die dabei auftretenden morphologischen Verhältnisse mit zu verfolgen. Ich habe mich hierzu vorerst fast ausschließlich der RIEGEL'schen Färbung ¹⁾

¹⁾ W. RIEGEL: Ein einfaches Verfahren zur Schnellfärbung von Ruhramöben zu diagnostischen Zwecken. Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. Bd. 22, 1918 p. 217.

OEHLER, Die RIEGEL'sche Amöbenfärbung beim Studium der feineren Struktur von Zuchtamöben. C. f. B. (Orig.) Abt. I 1923.

mit Chloroform-Methylenblau bedient. Dieselbe ist bequem und leistungsfähig. Sie gibt gute Bilder, aber leider keine Dauerpräparate.

Das käufliche Methylenblau ist ein Salz der Farbbase. Durch Zusatz von wässrigem Alkali wird die Farbbase frei und diese löst sich in Chloroform in rotvioletter Farbe. Solches ist die RIEGELsche Farblösung. Man bereitet sie, indem man 2—3 Körner Methylenblau (auch Toluol oder Kresylblau geben ähnliche Farbansätze) im Röhrchen mit einem Tropfen Kali- oder Natronlösung oder Ammoniak oder Soda + 5 ccm Wasser versetzt, dazu 6—8 ccm Chloroform gibt und durchschüttelt. Die rotviolette Chloroformfarblösung wird von der wässrigen Lösung abgehoben, allenfalls durch Filtrieren von Wasserresten gereinigt. So bereitet, hält sich die Farblösung wochenlang. Sie fixiert und färbt zugleich und das in kürzester Zeit. Die Amöben werden auf dem ausgestochenen Agarblock gefärbt; $\frac{1}{2}$ Minute genügt; überschüssige Farbmasse wird abgegossen oder mit Fließpapier am Rande abgesogen. Das Chloroform verdunstet. Ein Deckglas aufgelegt, und das Präparat ist fertig. Kerne werden blau, Plasma blaßblau; Vakuoleninhalt, je nachdem, blau oder rot. Blaue Farbe ist ein Hinweis auf saure Reaktion; rote Farbe deutet auf Alkali. Bakterien und Hefen auf der Platte nehmen nur wenig Riegelfarbe an. In den Amöben hingegen werden sie unter der Wirkung der Zellsäfte färberisch gebeizt und nehmen reichlich Riegelfarbe auf; meist erscheinen sie blau manche, wie Heubacillen, erscheinen auch rot.

An den Amöben unterscheidet man bei Riegelfärbung bei manchen Formen deutlich eine äußere glasige und eine innere, wolkig-blau gefärbte Ektoplasmaschicht. Besonders deutlich bei der Telleramöbe, aber auch bei der Amöbe Heidelberg und anderen unverkennbar. Die Teichamöbe 2 mit ihrem schmalen Ektoplasma zeigt nichts davon. Das Entoplasma ist körnig. Grobe, mittlere, feine und feinste Körner durchsetzen es. Meist sind dieselben in der Riegelfarbe nicht gefärbt: sie erscheinen als glänzende Weißkörner. Daneben zeigen sich auch blau gefärbte Körner, ähnlich glänzend wie die Weißkörner, vielleicht deren Vorstufen. Bei Teichamöbe 2 fand ich bei Fütterung mit Blut rote glänzende Körner und Schollen im Entoplasma und in den Verdauungsvakuolen auftreten, auch sie vielleicht Vorstufen der daneben auch vorhandenen Weißkörner. Die Rotkörner verlieren sich, wenn die Amöben auf eine nahrungslose Agarplatte übertragen werden. Auch die Weißkörner schwinden bei länger dauernder Nahrungsentziehung.

Das Entoplasma der hungernden Teichamöbe ist fast oder völlig frei von roten, größeren blauen und weißen Körnern. Es ist grob schaumig, indem rundliche Lichtungen von feinstkörniger Masse maschenartig umfaßt werden. In den Maschen erkennt man bei Riegelfärbung blaue feinste Körnchen, Stäbchen oder Hantelformen; alles fast an der Grenze der Sichtbarkeit. Der Inhalt der Lichtungen ist zart milchig getrübt.

Nimmt die Amöbe Nahrung auf, so wandert dieselbe rasch durch das bewegliche Ectoplasma und gelangt ins Entoplasma. Bakterien, Hefen, Algen nehmen hier alsbald die blaue Riegelfärbung an. Anfangs sind sie knapp vom Entoplasma umschlossen. Dann bildet sich die Verdauungsvakuole aus, indem eine wasserklare Zone das Nahrungskorn umschließt, und ein deutlicher Höhlungsraum die Vakuole vom Entoplasma abgrenzt. Die klare Flüssigkeit in der Verdauungsvakuole nimmt nun meist deutlich rote Farbe an; ein Zustand, der vorübergehend zu sein scheint, denn man findet Vakuolen mit versinterter krümeliger Nahrungsmasse und ungefärbter Vakuolenflüssigkeit. Das Ende des Verdauungsvorgangs ist schwer festzustellen. Ob die Nahrungskörner völlig durch Auflösung verschwinden, ob sie den Kern für die glänzenden Blau- und Rotkörner bilden, ob diese später ablassen und Weißkörner werden, vermöchte ich nicht zu sagen.

Der Amöbenkern ist bei Riegelfärbung als Caryosomkern gut erkennbar: außen eine Randmembran, dann eine lichte Zone; innen das Caryosom als kuchenförmiger blauer Körper, oft so, daß dessen Inneres als weniger gefärbte Mitte blau durchschimmert. Kernteilungen habe ich nicht gesehen, aber auch nicht weiter gesucht. Wohl möglich, daß die Chloroformfarblösung hierfür weniger günstig ist.

Die gereinigte Amöbenzucht erlaubt eine genauere Verfolgung der Verdauungsvorgänge in der Verdauungsvakuole, als das bei ungereinigter Zucht möglich ist. Wenn eine Amöbe neben grampositiven Bakterien auch Mengen von gramnegativen aufnimmt, dann kann man schwer sehen, wie die einen und wie die anderen sich bei der Verdauung verhalten. Über die feineren Vorgänge herrscht Unsicherheit, solange die Nahrung ungleichmäßig ist. Vor allem bin ich erst bei gereinigten Zuchten zur Einsicht gekommen, daß keineswegs alles verdaut wird, was aufgenommen wird. Manche, viele Amöben nehmen, wenn die Nahrung reichlich ist, solche Mengen auf, daß sie nicht bewältigt werden können, sondern nach kurzem

Aufenthalt in der Vakuole wieder als Losungsballen ausgestoßen werden. Die Losungsballen liegen als locker verklebte Bakterien- oder Hefeballen auf der Agarfläche, wohl unterschieden von den gleichmäßig ausgebreiteten, ausgestrichenen Bakterien an den amöbenfreien Stellen, auch deutlich verschieden von den durch die Amöbenwanderung verschobenen und zusammengemischten Bakterien oder Hefen auf dem Agar. Fütterung mit Hefe gab mir bei Amöbe Heidelberg und bei Telleramöbe besonders deutliche Bilder. Aber auch bei Amöbe BRESSLAU + *B. Xerosis* sind die Losungsballen deutlich und kennzeichnen die Wanderstraße der Amöben.

Die ausgestoßenen Losungsballen sind nur zum Teil Verdauungsrückstände. Was ausgestoßen wird, kann und wird wieder aufgenommen und unter Umständen auch verdaut. Es sind im Übermaß aufgenommene Nahrungsmengen. Die überfütterte Amöbe preßt aus, was sie nicht halten kann. Da sie aber unablässig weiter Nahrung aufnimmt, solange welche da ist, kommt es alsbald wieder zur Überfütterung und zwar Ausstoßung von Ballen. Die ausgestoßenen Ballen sind durch zarten Schleim gebunden. Sie bleiben nach RIEGEL ungefärbt oder nur wenig gefärbt, sind also noch nicht tiefer von den Vakuolensäften angegriffen. Ebenso konnte bei *Leptomyxa* die Ausstoßung von Kotballen festgestellt werden. Am deutlichsten bei der Zucht *Leptomyxa* + Rotbakterium. Das Rotbakterium ist ein gramnegatives Bakterium, dessen weitere züchterische Eigenschaften ich noch nicht feststellen konnte, das mit den *Leptomyxa*-Amöben aus Komposterde stammt. Es wächst vom Impfbock aus über die Agarfläche und die *Leptomyxa*-Amöbe konnte bis jetzt nicht von dem Rotbakterium getrennt werden. Bei Riegel-färbung nimmt das Bakterium zart rosa Farbe an, und die Leptomyxen zeigen in dem blau gefärbten Entoplasma kleine und größere Vakuolen mit roten Körnern, Ballen und Schollen, verbackene Rotbakterien. Solche Schollen und Ballen werden ausgestoßen und liegen als Losungsballen auf dem Agar, aber nur da, wo Amöben sind oder waren. Dagegen konnte ich mich bei Platten von Amöba BRESSLAU + Serum starr überzeugen, daß hier die Losungsballen unverdaute Rückstände sind, die die Amöbe ausstößt und nicht weiter verarbeitet.

Bei Riegel-färbung erscheint das auf der Agarplatte ausgestrichene Gallertserum zart rosa gefärbt. Rote lichte Massen und dunkelrote Schollen sieht man in den Vakuolen der Amöbe und . . . sattrot gefärbte schollige Körner liegen auf der Agarplatte. Letztere sind die ausgestoßenen Losungsballen, hier am Glanz und der stärkeren Färbung

deutlich von der aufgenommenen Serummasse unterscheidbar. Sie finden sich nur bei den Amöben, nicht auf der freien Zuchtfläche.

Die gereinigten Amöben- und Ciliatenkulturen geben uns so einen Einblick in die Verdauungsleistungen der Vakuolen und ihrer Fermente. Doch ist damit die experimentelle Verwendbarkeit der gereinigten Zuchten noch nicht erschöpft. Sie ermöglichen ferner, den Einfluß der verschiedenen Zersetzungsstoffe von Bakterienansätzen verschiedener Sorten auf die Ciliatenzelle zu prüfen. Ich habe über derartige Versuche schon berichtet,¹⁾ meine aber, es dürfte lohnen, auch diese Untersuchungen noch weiter auszubauen. Damals wurde gezeigt, daß menschenpathogene Bakteriengifte, wie Tetanustoxin und Diphtherietoxin gar keine besondere Wirkung auf Ciliaten ausüben. Was man an Vergiftung erkennen konnte, war nicht mehr, eher weniger, als was harmlose Bakterien, wie *Heubacillus* u. dergl. auch zur Erscheinung bringen. Wahrscheinlich meist Wirkungen der langsam steigenden Alkalität der Zuchtlösung. Immerhin war das eigen, daß die erzeugten Vergiftungserscheinungen sich ausschließlich im Plasma kundgaben, die zarte und verwickelte Cilienhaut und die Kerne aber völlig unberührt ließ. Die Plasmaerkrankung bestand in einer zunehmenden vakuolären Entartung, welche schließlich die Haut des Ciliaten zum Platzen brachte. Die Erscheinungen wurden mit WALLENGREENS Hungerparamäcium verglichen, und die Vermutung ausgesprochen, daß dieses Hungerparamäcium ein von Bakteriengiften vakuolisiertes Paramäcium ist. Es wäre reizvoll, das durch genauere Versuche zu belegen. Zwar kann Paramäcium nach meinen Erfahrungen durch Waschung und sonstige Unternehmen nicht völlig gereinigt werden. Es bleibt das gemeinste und aufdringlichste Wasserbakterium, das *Bact. fluorescens* immer als letzter und zähester Begleiter zurück. Aber die Zucht *Paramaecium* + *Bact. fluorescens* ist auch eine gereinigte Zucht, und mit ihr lassen sich immerhin einige Versuche ausdenken.

Die Zucht *Paramaecium* + *Bact. fluorescens* muß in Lösungen $\frac{10}{100}$ — $\frac{1}{10000}$ Pepton angesetzt werden, um die Wirkung der Peptonspaltlinge des *Bact. fluorescens* kennen zu lernen. Ergänzend wären auch Lösungen von Traubenzuckerpepton, sowie von einfachen Aminokörpern, als Harnstoff, Glycocoll und Asparagin zu versuchen. Die verwickelten Stoffmischungen, wie Harnverdünnungen und sterile

¹⁾ OEHLER: Wirkung von Bakteriengiften auf Ciliaten. Centralbl. f. Bakt. Bd. 86 1921 p. 494.

Heuaufgüsse haben auch ihr Interesse. Dann wären Bakterienmacerationen zu versuchen. Zunächst *Bact. fluorescens* dick in Wasser aufgeschwemmt und wochenlang bei 37° bebrütet. Es ist wahrscheinlich, daß da giftige Stoffe auftreten. Dann kann, wenn die Wirkung von *Bact. fluorescens* + Pepton bekannt ist, dieser Ansatz mit anderen Bakterien zubedacht werden, um deren Wirkung auf *Paramäcium* wenigstens annäherungsweise kennen zu lernen. Es ist wahrscheinlich, daß ein Ansatz *Paramaecium* + *Bact. fluorescens* + *B. subtilis* anders verläuft als ein solcher ohne den zweiten Bacillus. Bei allen diesen Versuchen ist auf die Cilienhaut, auf das Plasma und die Kerne zu achten. Daß es Gärungsansätze gibt, die auf die Cilienhaut wirken, konnte ich bei *Colpidium campylum* gelegentlich beobachten. Wird dieser Ciliat in $\frac{1}{100}$ Traubenzucker + Hefe angesetzt so übersteht er den leichten Gärungssturm 2—3 Tage und kann fortpflanzungsfähig auf andere Nähransätze übertragen werden. Gelegentlich aber kommen verzerrte und verkrüppelte Formen auf, Störungen der Cilienhaut, die sich bei guter Pflege in wenigen Tagen verlieren.

Ebenso ist auch auf Veränderungen des Groß- und Kleinkernes zu fahnden. Wenn JOLLOS¹⁾ den als *Endomyxis* bezeichneten Großkernzerfall durch Gaben von Ammoniak auslösen konnte, so ist zu erwarten, daß alkalibildende Bakterienzersetzungen ähnliches leisten. Die WOODRUFF'schen Zuchten sind meines Wissens noch nicht auf ihren Bakteriengehalt geprüft worden: ein Versäumnis, das der an die Arbeit mit gereinigten Zuchten gewöhnte Forscher nicht begreift — und nicht billigt.

Übersicht der vorstehend erwähnten Stämme und Zuchten.

Ciliaten.

1. *Colpoda Steini*. Ab Plattenzucht 1916 in Sterilzucht gewonnen. Wird in Wasser und Spinat 100° × 1 Stunde fortgeführt. Wächst im Wasser + Serum starr, aber nicht im Wasser + Serum flüssig.

2. *Colpoda cucullus*. 1919 ab Cysten + 37° × 6 Wochen bakterienrein gewonnen, seitdem mit *Saccharomyces exiguus* weiter geführt. Versuche, eine Steilzucht zu gewinnen, schlugen lange fehl, bis es 1923 gelingt, die ab Cysten + 64° × 24 Stunden erweckten und sterilen Ciliaten in Einzelfällen mit Spinat 100° × 1 Stunde am Leben zu erhalten und fortzuzüchten. Wächst nicht im Wasser +

¹⁾ JOLLOS: Biol. Centralbl. Bd. 36 1916.

Serum starr, aber schlecht, so daß die Zucht leicht nach 3—4 Übertragungen eingeht.

3. *Colpidium campylum*.

In den früheren Arbeiten fälschlich als *Colpidium colpoda* benannt, bis Prof. BRESSLAU die Bestimmung als *Colpidium campylum* richtig stellte. Keine Sterilzucht bisher erreicht; wohl aber gereinigte Zucht. Mit *B. subtilis* als alleinigem Nähr- und Begleitbakterium. Diese monobakterielle Zucht wurde gewonnen durch Verdrängung der Wasserbakterien $\frac{1}{100}$ Pepton + Heubacillus. Sie wird fortgeführt in $\frac{1}{100}$ oder $\frac{1}{1000}$ Traubenzuckerpepton, worin sich die Colpidien monatelang halten. Bakterienfreie Colpidien können erreicht werden, indem bei Übertragung auf $\frac{1}{100}$ Traubenzucker und Hefe die Heubazillen verschwinden und die Colpidien 1—2 Tage bestehen; also auf Wasser + ein beliebiges Nährbakterium überführt werden können. Hefe nährt die Colpidien nicht, weil der Schlund zu eng ist, um die Aufnahme zu gestatten.

4. *Balantiophorus* + *B. fluorescens*.

Von Dr. AMSTER gewonnen. Zucht ab elektrisch betriebener Waschung. Das *B. fluorescens* mit meinen Mitteln zu vertreiben, gelang nicht. Es wäre erwünscht, zu wissen, ob die AMSTER'sche elektrische Waschung das vermag.

5. *Paramaecium caudatum*, *Par. putrinum*, *Par. bursaria*, weiß und *Par. bursaria* + *Chlorella*-Einlagerung, alle in monobakterieller Zucht mit *B. fluorescens* als alleinigem Begleiter. Gewonnen durch Anreicherung mit *B. fluorescens*, bis die anderen Wasserbakterien vertrieben sind. Die Zuchten sind versuchsmäßig noch nicht durchgearbeitet. Es fehlt die Einwirkung genügend macerisierter und zerfallender Fluoreszenzbakterien auf die Paramäcien, sowie das weitere Studium der Einwirkung von Stoffzersetzungen, bewirkt durch *B. fluorescens*.

Flagellaten.

6. *Polytoma urella*.

Sterilzucht, gewonnen nach Anreicherung im *Ogata*-Steigrohr, ab Ausstrich auf Bouillon-Agar. Wird gehalten auf LÖFFLER-Serum und in dessen Kondenswasser. Gelbliche Kolonien auf dem Serum, in denen die *Polytoma*-Zellen keine Geißeln haben. Solche entwickeln sich im Wasser in 10 Minuten. Der Flagellat war früher genügsamer in seinen Ansprüchen an Zucht und Nährboden. Er wuchs nach der Reingewinnung monatelang auf Bouillon-Agar, in $\frac{1}{1000}$

Pepton und war ausdauernd. Heute, nach etwa 4jähriger Fortführung auf LÖFFLER-Serum will er auf Bouillonagar, in Bouillon und Peptonverdünnungen nicht mehr angehen. Kleie, LÖFFLER-Serum und dessen Kondenswasser führt die Zucht fort, und auch da muß 14tägig bis 4 wöchentlich überimpft werden. Die 1916—1919 gewonnenen Sterilzuchten von Kleinflagellaten existieren nicht mehr.

Amöben.

Ebenso sind die damals erreichten Sterilzuchten von Amöben nicht fortgeführt worden. Ich war damals der Ansicht, das ließe sich jederzeit rasch wieder gewinnen. Das scheint eine Überschätzung gewesen zu sein; denn von *Hartmannella aquarum* habe ich mich nachher lange bemüht, die Sterilzucht wieder zu gewinnen, ohne Erfolg. Böse Begleitbakterien drängten sich immer wieder vor. Cystensterilisation habe ich allerdings noch nicht versucht.

Dagegen habe ich neuerdings einige Amöben auf Wasser-Agar + Serum starr zur Sterilzucht gebracht.

7. *Amoeba* BRESSLAU.

Dies der Laboratoriumsname, da der systematische Name noch aussteht. Eine Wasseramöbe, kenntlich durch ihre 3fache Form. a) Die Schwebeform im Wasser ist die der *A. radiosa* mit etwa 10 Strahlen: ein richtiger Morgenstern, b) die Haftform am Glase: ein schmaler Haftansatz ist an die Glaswand angeklebt, und fächer- oder blattartig ragt die Amöbe ins Wasser, c) die Kriechform auf der Agarplatte mit Pseudopodien, die die Bewegung betreiben. Zeigt bei Riegelfärbung manchmal, nicht immer gleich deutlich eine 3-Schichtung des Protoplasma. Außen an den Pseudopodien und bei der blattförmigen Haftform lichtet, glashelles ungefärbtes Ectoplasma. Daran anschließend ein Saum von ungekörntem Plasma, das wolkig-blaue Farbe angenommen hat. Das Entoplasma hält wenig Weißkörper und Netzfasern; Vakuolen meist klein. Kern mit Membran, lichter Zone und kuchenförmigem blauem Binnenkörper. Stößt Kot- und Losungsballen aus. Wächst gut auf gramnegativen Bakterien; langsamer auf Xerosebakterien, geht steril auf die mit Gallertserum bestrichene Agarschicht über. Hält dann keine Weißkörper; färbt sich dunkel in Riegelfarbe und zeigt rosa gefärbte Nahrungsvakuolen, die satt rot gefärbte Schollen als Kotballen ausstoßen. Zuchtansätze, Wasser ausdauernd, halten 2—3 Monate. Cysten klein und spärlich. Größe der Cysten 3 μ . Größe der Amöbe 6—8 μ .

8. Teichamöbe.

Auch eine Wasseramöbe, aber ohne die radiose Schwebeform, ohne die blattartige Haftform. Die Kriechform langgestreckt, oft aber mit zweigartigen Ansätzen. Größe der gestreckten Amöbe 10 μ ; der gerundeten Amöbe 6 μ . Cysten spärlich 4 μ groß. Ectoplasma licht, glasig, in Riegelfarbe ungefärbt; umhüllt in nicht sehr breitem Saum das Entoplasma. Eine Wolkenschicht kommt nicht deutlich zur Ausbildung. Das Entoplasma trägt zahlreiche Weißkörner, meist mittelgroß, unter Umständen auch bis zu 100 $\mu\mu$ großen Schollen, die das ganze Plasma überfüllen. Diese sind in Riegelfärbung farblos. Sie schwinden beim Nahrungsmangel. Die blaugefärbten, Blaukörner und das feine Netzwerk blauer Fasern ist weniger dicht als bei Amöba BRESSLAU. Die Vakuolen von den Weißkörnern oft überdeckt. Der Kern ein gangbarer Caryosomkern. Läßt sich von den Wasserbakterien auf der Agarplatte reinigen; wächst auf der Platte, auf dem Schrägröhrchen und in Wasser bei Ernährung mit *B. Xerosis*, mit *Saccharomyces exiguus*; mit dem LINDNER'schen Fetthefepilz, mit Einzellalgen, wie *Chlorella* usw. Stößt keine Losungsballen aus; scheint große und kleine Zellen ziemlich restlos zu verdauen. Nur die Cellulosehüllen der Algen finden sich als Reste auf der Platte. Geht auf die Gallertserumschicht der Agarplatte über und läßt sich von da auf Schrägagar-röhrchen mit Gallertserumaufstrich übertragen und steril weiter führen. Die mit Serum gefütterten Amöben halten Weißkörner. Zucht im Wasserröhrchen + *B. Xerosis* oder in $\frac{1}{1000}$ Pepton + *B. Xerosis* hält monatelang aus. Cysten, wie gesagt, spärlich.

In der Arbeit bisher nicht erwähnt, aber hier geeignet mitteilbar sei der Pseudomyxomycet *Dictyostelium mucoroides* als verwendeter Zuchtstamm angeführt.¹⁾

9. *Dictyostelium mucoroides*. Pseudomyxomycet.

Stammt ab Mist. Bildet mucorartige Fruchtstände, aus deren Sporen eine Amöbe aufgeht, welche Bakterien zehrt, sich vermehrt und bei Nahrungsmangel zu Zügen und Knoten sich zusammenlegt, aus denen der Fruchtstand mit den Sporen im Köpfchen des Fruchtstandes erwächst. Keimt nur bei Anwesenheit von Bakterien. Keimt nicht oder keimt und verfällt auf Serumgallert.

10. *Leptomyxa*. Art beschrieben von GOODY.²⁾ Mehrkernige

¹⁾ OEHLER: Demonstration auf dem Mikrobiologentag in Würzburg 1922. Centralbl. f. Bakt. I.

²⁾ GOODY: Arch. f. Protistenk.

Großamöbe bis 100 $\mu\mu$ groß. Kerne 1—50. Kernmembran zart: lichte Zone schmal; Binnenkörper kuchenförmig. Ectoplasma schmal, licht, nimmt keine Riegelfarbe an. Bildet Fransen und zarte Ausstrahlungen. Entoplasma trägt keine Weißkörper; lichtblaues, wolkiges oder sehr feingemustertes Netzwerk von Blaukörnern und Fasern; umschließt zahlreiche Wasservakuolen von beträchtlicher Größe, deren Pulsation wegen der Langsamkeit des Vorgangs nicht verfolgt werden kann. Nahrung liegt staubförmig oder geballt im Plasma, ohne sichtbaren Vakuolenrand. Stößt Kot- oder Losungsbällen aus. Bisher nur monobakteriell mit dem Begleiter Rotbakterium zur gereinigten Zucht gebracht. Auf der Agarplatte mit Gallertserum kamen einige Leptomyxen zu Gesicht. Sie zeigten Weißkörper, liches Entoplasma; keine erkennbaren Nahrungsvakuolen, keine Kotbällen. Übertragung auf Röhrchen gelang noch nicht in reinem Zustand.

Was sonst noch an Amöben, Flagellaten und Ciliaten in Zucht und Bearbeitung steht, ist in der Reinigung noch so rückständig, daß hier nichts erwähnt werden kann.

11. *Amoeba* Heidelberg.

Mittelgroße Wasseramöbe, sonst noch wenig untersucht und bisher der Reinigung nicht zugeführt. Die Amöbe ist ausgezeichnet durch einen kleinen hefeähnlichen Symbionten, der in rundlichen Vakuolen in dem Entoplasma der Amöbe wuchert. Es werden Ballen dieser Kleinhefen aus der Amöbe ausgestoßen. Sie liegen auf der Agarplatte, wo Amöben waren, aber nicht auf den amöbenfreien Stellen der Platte. Die Zucht der parasitischen Kleinhefe gelang bisher nicht.

12. Telleramöbe.

Diese, etwa 60—80 μ große, immer tellerrunde Amöbe stammt aus Garten- und Komposterde. Sie hat einen breiten Ectoplasmasaum, dessen äußere Schicht in Riegelfarbe glasig ungefärbt bleibt, während die innere Zone wolkig-blau wird. Das Entoplasma hält feine Blaukörper und feines Netzfaserwerk, das sich blau färbt. Als Nahrung nimmt die Amöbe gern Cysten von anderen Amöben auf. Der Kern ist bläschenförmig, hält keinen Binnenkörper in der Mitte. Alles Chromatin ist in Schollen und Platten dicht unter der Kernmembran angeordnet. Der Binnenraum des Kerns ist leer. Die Amöbe wandert langsam ohne Bildung von Pseudopodien. Sie vermehrt sich auch langsam. Reinigung wollte darum bis jetzt nicht gelingen.

Meinen Dank an die Institute, in denen ich vorstehende Arbeiten ausführen konnte, habe ich schon erwähnt. Es sind das Hygienische Institut (Direktor: Geh. Rat NEISSER) und das Georg Speyer-Haus (Direktor: Geh. Rat KOLLE); beide in Frankfurt a. M.

Für Überlassung von Zuchten und Stämmen danke ich Frl. Prof. WESTERDYK in Baaren (Holland), Institut für Schimmelkunde, Herrn Prof. HARTMANN Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie; Herrn Studienrat SPENG in Chemnitz; Prof. LINDNER vom Gärungschemischen Institut in Berlin; Herrn Dr. ARNDT, Institut für Tropenhygiene in Hamburg; Herrn Prof. REICHENBACH, Göttingen.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Archiv für Protistenkunde](#)

Jahr/Year: 1924

Band/Volume: [49_1924](#)

Autor(en)/Author(s): Oehler Rud.

Artikel/Article: [Weitere Mitteilungen über gereinigte Amöben- und Ciliatenzucht. 112-134](#)