DER GEGENWÄRTIGE STAND DER FORSCHUNG AUF DEM GEBIET DER FLUORESZENZMIKROSKOPISCHEN UNTERSUCHUNG DER BAKTERIEN / IN MEMORIAM M. HAITINGER[1])

Mit 4 Abbildungen

Von PROF. DR. SIEGFRIED STRUGGER
(Vorstand des Botanischen Institutes der Universität Münster in Westfalen)

Es ist das große Verdienst des kürzlich verstorbenen Forschers M. HAITINGER, die Aufmerksamkeit der Biologen und Mediziner auf die große Bedeutung des Fluoreszenzmikroskopes als neuzeitliches Forschungsmittel gelenkt zu haben. Unermüdlich wies der greise Gelehrte in seinen Publikationen auf die neuen Möglichkeiten hin, welche das Fluoreszenzmikroskop dem methodischen Ausbau der Medizin und Biologie zu geben imstande ist. Dadurch sind seine Arbeiten zweifellos der Anlaß zu einer fruchtbaren Entwicklung der Forschung auf diesem Gebiete geworden. Die Histologie, die pathologische Histologie, die Protoplasmaforschung und Zellphysiologie, die Pflanzen- und Tierphysiologie haben durch die Fluoreszenzmikroskopie innerhalb der letzten 15 Jahre eine starke Förderung erfahren. Dies gilt auch für das Gebiet der Bakteriologie. Die Fluorochromierung der Bakterien im fixierten und lebendigen Zustand und die Untersuchung der so behandelten Keime mit dem Fluoreszenzmikroskop ist ein entscheidender Fortschritt auf dem Gebiet der Erforschung der Bakterien. Seit der Einführung der Färbung fixierter Ausstriche mit Anilinfarbstoffen durch WEIGERT (1875) und GRAM (1884) und seit der Schaffung der grundlegenden Technik der Bakterienisolierung und -kultur durch Robert KOCH und seine Schule ist die Einführung der Fluoreszenzmikroskopie in die bakteriologische Untersuchungstechnik zweifellos einer der bedeutendsten Fortschritte der Neuzeit. Zwar bewirkt das natürliche konservative Beharrungsvermögen in der Wissenschaft eine gewisse Latenzzeit. Es ist aber durch die bisherigen Vorarbeiten schon der Beweis erbracht worden, daß die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung fluorochromierter Bakterien sich in der zukünftigen bakteriologischen Forschung ihren Platz sicher erobern wird.

I. Die Fluorochromierung fixierter Bakterienausstriche.

Die Methode der Fluorochromierung fixierter Bakterienausstriche wurde zuerst von HAGEMANN (1937) an Lepra- und Tuberkelbakterien angewandt. Diese Arbeiten zeigten, daß sich in fixierten Sputumausstrichen Tuberkelbakterien mit Berberinsulfat oder Auramin deutlich fluorochromieren lassen. Die nicht säurefesten Begleitbakterien lassen sich durch heißes Wasser oder durch Salzsäure-Alkohol leicht entfärben. In derartig vorbehandelten

[1]) Diese Arbeit ist dem in Kürze erscheinenden Sonderheft „Fluoreszenzmikroskopie" entnommen.

Präparaten leuchten die gelbgrün fluorochromierten säurefesten Bakterien auf dunklem Grunde in schönstem Kontrast, so daß das Auffinden vereinzelter Tuberkelbakterien im Sputum außerordentlich erleichtert ist. Infolge der großen praktischen Bedeutung dieser Methode der Darstellung säurefester Stäbchen haben sich mit der Überprüfung und dem weiteren Ausbau der HAGEMANNschen Methodik zahlreiche Arbeiten beschäftigt. (HERRMANN 1938, CLAUBERG 1939, HAITINGER und SCHWERTNER 1939, BACHMANN 1939, BACHMANN und FINKE 1939, DIDION 1939, DABELSTEIN 1939, SCHALLOK 1940, JUNG 1940, RIHL 1940.) Im wesentlichen stimmen alle Nachuntersuchungen darin überein, daß die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Tuberkelbakterien mit Auramin gegenüber der ZIEHL-NEELSEN-Färbung einen bedeutenden Fortschritt darstellt. Die Ausbeute laufender klinischer Untersuchungen hat sich im allgemeinen als zuverlässiger und besser erwiesen, wenn mit der HAGEMANNschen Methode gearbeitet wird. Auch der Zeitgewinn bei laufenden Untersuchungen wird von allen Autoren hervorgehoben. Zusammenfassend kann also berichtet werden, daß die fluoreszenzmikroskopische Methode der Darstellung säurefester Bakterien in fixierten Ausstrichen heute bereits eine hervorragende praktische Rolle spielt und in Zukunft noch einen weiteren erfolgreichen Ausbau erfahren wird.

Mit geeigneten Fluorochromen lassen sich alle Bakterien in fixierten Ausstrichen eindrucksvoll darstellen. Zur Theorie dieser Fluorochromierung haben ich (1942) und mein Schüler DENZLER (1942) die ersten Beiträge geliefert. Die basischen (kathodischen) Fluorochrome sind entschieden mit größerem Vorteil zu verwenden als die sauren (anodischen) Fluorochrome. Gemäß der Abhängigkeit der Dissoziation der Fluorochrome vom p_H-Wert des Lösungsmittels konnten STRUGGER und DENZLER klar zeigen, daß basische Fluorochrome unter der Berücksichtigung der Lage des IEP der Bakterienprotoplasten (isoelektrischer Punkt der Bakterien gewöhnlich zwischen p_H 3—4) zwischen p_H 4 und p_H 7 den besten Fluorochromierungseffekt liefern, während die sauren Fluorochrome unterhalb des IEP der Bakterienprotoplasten, also in der Regel unter p_H 3, erst in der Lage sind, eine wirksame Fluorochromierung der Bakterien zu bewirken. Es ist nach diesen Untersuchungen evident, daß die Fluorochromierung fixierter Bakterien auf einer elektrostatischen Absorption der fluoreszierenden Kationen oder Anionen beruht. Die Erkenntnis der p_H-Abhängigkeit der Fluorochromierung ist eine wichtige theoretische Grundlage für den weiteren praktischen Ausbau der Fluorochromierungstechnik an fixierten Bakterienausstrichen. Die nebenstehenden Tabellen 1 und 2 geben einen Einblick in diese Verhältnisse auf Grund von Untersuchungen an Sarcina lutea.

Eingehende Untersuchungen, welche in der letzten Zeit an basischen und sauren Fluorochromen von mir durchgeführt wurden, ergaben, daß folgende basische Fluorochrome für die Praxis der Fluorochromierung fixierter Bakterienausstriche besonders gut brauchbar sind: Auramin, Akridingelb, Akridinorange, Coriphosphin, Flavophosphin, Rivanol und Berberinsulfat. Von

download unter www.biologiezentrum.at

Tabelle 1

Auramin

p_H	Fluoreszenz
2,02	grünlich-gelb +
3,51	grün-gelblich +++
6,34	grün ++++
9,04	grün ++++
11,13	blau-grünlich +

Tabelle 2

Fluoreszeinkalium

p_H	Hitzefixation	Alkoholfixation
2,05	gelb-grün +++	grün-gelblich ++
3,52	grün-gelblich +++	gelb-grün +++
6,44	grün-gelblich (+)	bläulich-grün (+)
10,27	blau-grün (+)	blau-grün (+)
11,27	blau-grün +	blau-grün +

den sauren Fluorochromen hat sich praktisch u. a. besonders das Brillantsulfoflavin F. F. bewährt.

Die Technik der Fluorochromierung fixierter Bakterienausstriche ist folgende. Auf dem Objektträger hergestellte Ausstriche werden in üblicher Weise hitzefixiert und durch Überkuppen oder in Färbetrögen mit einer wäßrigen Lösung des betreffenden Fluorochroms (Konzentration 1 1000), welche auf den entsprechenden p_H-Bereich durch Pufferung eingestellt wird, $^1/_2$—5 Minuten eingefärbt. Die Färbezeit muß bei jedem Fluorochrom durch eine Reihenuntersuchung bestimmt werden. Dann wird mit Wasser von annähernd demselben p_H-Bereich abgespült und an der Luft trocknen gelassen. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung kann ohne Deckglas mit Immersionsobjektiven oder auch mit Deckglas durchgeführt werden. Im letzteren Falle wird als Einbettungsmedium Paraffinum liquidum benutzt, welches sich für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen als Medium optisch recht vorteilhaft erwiesen hat. Auf diese Weise ist es möglich, mit einem relativ schnellen Färbeverfahren Bakterienausstriche in bester Weise der fluoreszenzmikroskopischen Beobachtung zugänglich zu machen.

Auf dem Gebiete der elektiven Sporenfluorochromierung konnte ich (STRUGGER 1946) einen ersten Fortschritt erzielen. Mit dem sauren Fluorochrom Brillantsulfoflavin F. F., welches sich durch eine besonders hohe Dispersität auszeichnet, gelingt es, unter Zusatz von Phenolum lique-

factum an hitzefixierten sporenhaltigen Ausstrichen neben den nicht sporulierenden Bakterienzellen auch die Sporen in grell grüngelber Fluoreszenzfarbe zu fluorochromieren. Da ein basisches Fluorochrom, welches grob dispers ist, wie z. B. Coriphosphin, die Sporen in schwach saurer Lösung nicht zu fluorochromieren vermag, wohl aber bei einer Nachfärbung die nicht sporulierenden Bakterienanteile und Bakterienzellen in kupferroter Fluoreszenzfarbe anfärbt, ist es durch eine Coriphosphin-Gegenfärbung, welche oberhalb des isoelektrischen Punktes der Bakterienprotoplasten durchgeführt wird, möglich, die grüngelb fluoreszierenden Sporen in schöner Weise gegenüber den nicht sporulierenden Bakterien (kupferrot leuchtend) zu kontrastieren (vgl. Abb. 1). Eine Arbeitsvorschrift dieser Doppelfluorochromierung für Untersuchungen an sporenhaltigem Material sei kurz angeführt.

1. Gute Hitzefixation des Ausstriches.

2. Überkuppen des Objektträgers mit einer Brillantsulfoflavin-Lösung 1 400 in aqua dest. plus 0,5% Phenolum liquefactum. Leichtes Erhitzen des Objektträgers über der Flamme bis Dampfbildung auftritt. Dauer der Färbung 1—2 Minuten.

3. Gutes Abspülen mit aqua dest. (Spritzflasche).

4. Nachfärbung mit einigen Tropfen einer Coriphosphin-Lösung 1 1000 in aqua dest. Dauer etwa 40 Sekunden.

5. Abspülen mit aqua dest.

6. Trocknen des Ausstriches und Abdecken mit einem Deckglas in Paraffinöl.

Dieses Verfahren eignet sich auch für stark verunreinigte Präparate. Auch an Bodenausstrichen läßt sich der Sporengehalt mit dieser Methode fluoreszenzmikroskopisch untersuchen.

Auf dem Gebiet der Fluorochromierung von Viruskörpern sind seit den Arbeiten von HAGEMANN (1937) noch keine wesentlichen Fortschritte erzielt worden.

II. Die Fluorochromierung lebender Bakterien (Akridinorange-Methode)

An höheren Pflanzenzellen konnte ich (STRUGGER 1940) nach langer systematischer Suche eine möglichst unschädliche Vitalfluorochromierung der Eiweißkomponenten des lebenden Protoplasmas mit Akridinorange durchführen. Dieses basische Fluorochrom hat infolge seiner Molekülgestalt die besondere Fähigkeit, sich außerordentlich rasch auf dem Wege der Elektroadsorption in das submikroskopische Gefüge der Eiweißkörper des lebenden Protoplasmas einzulagern und dort eine leicht nachweisbare Grünfluoreszenz hervorzurufen. Alle lebenden Bestandteile der Zelle, wie das Zytoplasma, der Zellkern, fluoreszieren dann grün. In günstigen p_H-Bereichen (p_H 5—7) werden die Zellulosemembranen und die Zellsafträume im scharfen Gegensatz zur Fluorochromierung der lebenden Protoplasten in kupferroter Fluoreszenzfarbe vom selben Fluorochrom angefärbt. Das Gesamtbild einer Meta-

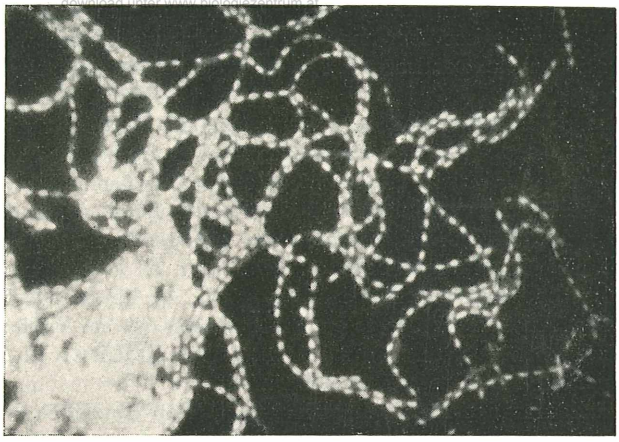

Abb. 1. Mikrophotographische Aufnahme eines Ausstriches von Bacillus mycoides. Elektive Sporenfluorochromierung mit Brillantsulfoflavin F. F.

phytenzelle im vital fluorochromierten Zustand ist dann folgendes: Die Zellmembranen leuchten kupferrot, das Zytoplasma erscheint homogen grün, während die Zellkerne eine besonders starke Speicherung des Akridinorange in den Chromatinstrukturen (Chromonema) in gelbgrüner Fluoreszenzfarbe erkennen lassen. Der Zellsaftraum ist in der Regel homogen kupferrot fluorochromiert. Es treten aber in manchen Zellen auch kupferrot leuchtende Krümel in Erscheinung. BUKATSCH und HAITINGER (1940) und BUKATSCH (1940) geben das Akridinorange ebenfalls als brauchbares Fluorochrom zur Darstellung zytologischer Einzelheiten an. Das Auftreten zweier Fluoreszenzfarben mit demselben Fluorochrom habe ich schon 1940 theoretisch klären können. Das Fluoreszenzspektrum dissoziierter, wäßriger Akridinorangelösungen ändert sich nämlich stark mit dem Wechsel der Konzentration. Im Konzentrationsbereich 1 5000—1 100.000 fluoreszieren solche Lösungen grün, während im Konzentrationsbereich 1 1000—1 5000 eine gelbgrüne Fluoreszenz zu beobachten ist. Wird die Konzentration auf 1 100 bis 1 500 gesteigert, so ist die Fluoreszenzfarbe kupferrot. Der Schwerpunkt des Fluoreszenzspektrums verschiebt sich also mit zunehmender Konzentration der Farblösung nach der langwelligen Seite des Spektrums (Konzentrationseffekt). Diese Erscheinung ist bei Verdünnung reversibel. Auf experimentellem Wege konnte ich damals zeigen, daß die grüne Fluoreszenz des vital fluorochromierten Protoplasten darauf beruht, daß selbst bei längster Färbedauer und Bietung eines namhaften Farbstoffüberschusses das Eiweißsystem des lebenden Protoplasten nur eine begrenzte Menge von Akridinorange-Kationen zu speichern vermag. Daher kommt es auch bei längeren Färbezeiten, solange der Protoplast lebt, nicht zu einer so starken Anreicherung von Akridinorange-Kationen im Eiweißsystem des lebenden Protoplasten, daß eine rote Fluoreszenzfarbe zustande kommen könnte. Die sekundäre Fluoreszenz des lebenden Protoplasmas ist also unter allen Um-

ständen grün. In bezug auf die Zellmembranen und die Zellsafträume liegen die Verhältnisse aber anders. Diese Systeme können weitaus mehr Farbstoffkationen elektroadsorptiv binden, wodurch es zur sekundären Rotfluoreszenz kommt.

Während das lebende Protoplasma im Hinblick auf sein Farbstoffadsorptionsvermögen ein geschlossenes System darstellt, ist das tote Protoplasma in dieser Hinsicht ein durchaus offenes System. Die Eiweißkörper des toten Protoplasmas verhalten sich so wie die Zellmembranen. Unter der Voraussetzung des Vorhandenseins eines genügenden Farbstoffüberschusses kommt es bei der Fluorochromierung des toten Protoplasten zu einer sehr starken elektroadsorptiven Anreicherung von Akridinorange-Kationen. Die sekundäre Fluoreszenz des toten Protoplasmas ist bei Färbung oberhalb des IEP (zwischen p_H 5 und 7) immer kupferrot. KÖLBEL (1947) konnte in meinem Institut durch messende kolorimetrische Untersuchungen diese Theorie der Akridinorange-Fluorochromierung in allen Einzelheiten bestätigen. Die quantitative Bestimmung der Farbstoffaufnahme lebender und toter Hefezellen ergab die in Abb. 2 dargestellten Werte. Über den zeitlichen Verlauf der Farbstoffspeicherung geben die Untersuchungen KÖLBELs einen für den methodischen Ausbau der Akridinorange-Fluorochromierung höchst wertvollen Aufschluß. Wie Abb. 3 zeigt, erfolgt die Absättigung lebender und toter Hefezellen mit Akridinorange innerhalb sehr kurzer Zeiträume.

Damit ist eine neue Methode gegeben, um lebendes und totes Protoplasma experimentell exakt zu unterscheiden. Die Akridinorange-Fluorochromierung ermöglicht somit einerseits die Vitalfärbung der lebenswichtigen Zellstrukturen und andererseits bei richtiger methodischer Handhabung eine Aussage über den Lebenszustand der untersuchten Protoplasten. Der Lebensablauf der mit Akridinorange vital fluorochromierten Zellen erwies sich als völlig ungestört. Hefezellen können sich im vital fluorochromierten Zustand normal vermehren (STRUGGER 1943). An Mucorineen konnte JOHANNES zeigen, daß der normale Lebenszyklus an Individuen, deren Zytoplasma und Zellkerne mit Akridinorange vital gefärbt waren, völlig normal abläuft. Damit ist für die Biologie eine Methodik geschaffen, mit deren Hilfe man am wachsenden Organismus feinste zytologische Untersuchungen durchführen kann. Ein sehr eindrucksvolles Beispiel für die relative Unschädlichkeit der Akridinorange-Fluorochromierung konnte von STRUGGER und ROSENBERGER (1944) erbracht werden. Ziegenbocksperma wurde in vitro mit Akridinorange vorsichtig fluorochromiert. Die fluoreszenzmikroskopische Prüfung der Spermatozoen ergab eine grüngelbe Sekundärfluoreszenz der Chromatinbestandteile der Kerne und eine grüne Fluoreszenz des Zytoplasmas. Das Bewegungsvermögen der Spermatozoen war ungestört. Künstliche Besamungsversuche mit solchen Spermatozoen ergaben ein positives Resultat.

Die Übertragung der Akridinorange-Vitalfluorochromierung auf die bakteriologische Untersuchungsmethodik erfolgte in den Jahren 1941, 1942, 1943, 1944 durch STRUGGER und durch STRUGGER und HILBRICH. Das Ziel dieser mikrobiologischen Arbeiten war ein zweifaches.

www.biologiezentrum.at

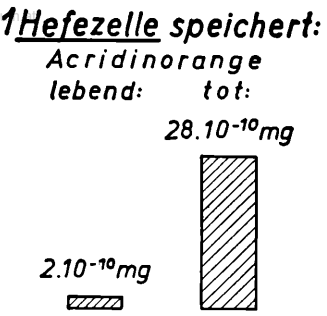

Abb. 2. Die Speicherung von Akridinorange durch eine lebende und eine tote Hefezelle. Ergebnisse quantitativer kolorimetrischer Bestimmungen nach KÖLBEL (1947).

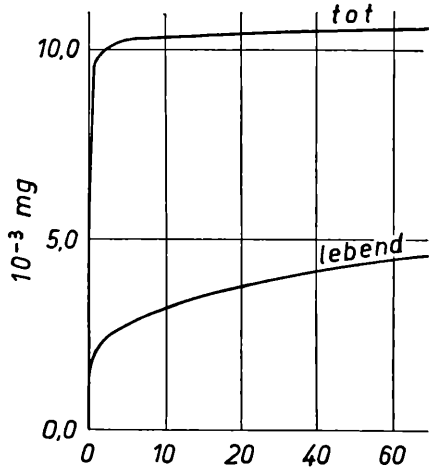

Abb. 3. Quantitativer Verlauf der Akridinorange-Speicherung durch je 0,2 g lebende bzw. tote Hefezellen. Konzentration des Akridinorange = 0,5 ·10⁻³ Mol/l. Nach kolorimetrischen Messungen von KÖLBEL (1947).

1. Es sollte eine Schnellmethode zur Vitalfluorochromierung von Mikroorganismen geschaffen werden. Unter möglichster Zeitersparnis sollen mit dieser Methode unter optisch günstigsten Verhältnissen zytologische Untersuchungen an lebenden Bakterienzellen ermöglicht werden.

2. Auf Grund der Erfahrungen über die Fluorochromierung des lebenden und toten Protoplasmas mit Akridinorange sollte eine Fluorochromierungsmethode zur fluoreszenzmikroskopischen Unterscheidung lebender und toter Bakterienzellen ausgearbeitet werden.

Ad 1. Die Schnellfluorochromierung lebender Bakterien mit Akridinorange ist eine ausgesprochene Vitalfärbungsmethodik. Unter möglichst günstigen Bedingungen sollen lebende Bakterien mit Akridinorange so fluorochromiert werden, daß ihre Eigenbeweglichkeit nicht gehemmt wird und daß zytologische Untersuchungen am Bakterienprotoplasten ermöglicht werden. Dabei braucht kein besonderer Wert darauf gelegt zu werden, daß alle toten Bak-

terien durch hinreichende Farbstoffgaben auch eine Rotfluoreszenz ihrer Protoplasten zeigen. Diese ausgesprochene Vitalfärbungstechnik läßt sich einfach und überaus zeitsparend folgendermaßen durchführen. Eine Akridinorange-Lösung 1 20.000—1 40.000 wird in einem entsprechenden, physiologisch ungiftigen Medium hergestellt (physiologische Kochsalzlösung, Leitungswasser, Zuckerlösung, Nährbouillon u. a.). Hierauf wird in einen Tropfen dieser Akridinorange-Lösung auf dem Objektträger das Bakterienmaterial mit der Öse eingetragen, etwas verrührt und mit einem Deckglas zugedeckt. Da das Akridinorange fast augenblicklich von den Bakterienprotoplasten gespeichert wird, brauchen keine besonderen Färbezeiten eingehalten zu werden. Die Untersuchung kann unmittelbar nach der Herstellung des Präparates im Fluoreszenzmikroskop erfolgen. Es ist zweckmäßig, mit einer Ölimmersion und einem lichtstarken Blaulicht-Fluoreszenzmikroskop zu arbeiten. Die Protoplasten der lebenden Bakterien werden in grüner Fluoreszenzfarbe fluorochromiert. Derbere Membranen sowie Kapseln und größere Vakuolen (bei Spirillen) erscheinen in kupferroter Fluoreszenzfarbe. Die Einzelheiten der Plasmakonfiguration sind intravitam ungestört zu beobachten. Die Beweglichkeit der Formen bleibt bei vorsichtiger Anfärbung voll erhalten. Ein bloßer Vergleich mit den Ausstrichpräparaten, welche nach der bisher üblichen Methode gewonnen wurden, zeigt den großen Fortschritt, welchen dieses Schnellverfahren für zytologische Studien an lebenden Bakterien bietet. Verwendet man wenig Bakterienmaterial und eine etwas stärkere Akridinorange-Konzentration, so werden auch in diesen Präparaten die abgestorbenen Bakterienprotoplasten kupferrot fluorochromiert. Der Zeitgewinn dieses Schnellverfahrens ist nicht zu unterschätzen. Während normale Ausstriche erst nach 10 Minuten zur mikroskopischen Prüfung gelangen können, arbeitet dieses Schnellverfahren ohne nennenswerten Zeitaufwand. Dazu kommt der große Vorteil, daß mit diesen vital gefärbten Bakterien noch weiter experimentiert werden kann. Sowohl Kultur- als auch Tierversuche können durchgeführt werden. Für die serienmäßige Reinheitsprüfung von Bakterienkulturen hat sich dieses Schnellverfahren in meinem Laboratorium bewährt.

Zur Untersuchung des Blutes auf Parasiten ist die Vitalfluorochromierung mit Akridinorange besonders geeignet. Zum Beispiel können Blutproben, welche Trypanosomen in relativ geringer Zahl enthalten, nach Einfärbung eines frischen Bluttropfens mit einer Akridinorange-Lösung 1 20.000 (physiologische Kochsalzlösung) auf ihren Gehalt an Trypanosomen leicht untersucht werden. Das Akridinorange fluorochromiert nur die Leukozyten und die Parasiten, nicht aber die Erythrozyten. Die letzteren erscheinen sonach im Präparat dunkel, während die Leukozyten in grüner Fluoreszenzfarbe voll ausgefärbt zu sehen sind. Da die Masse der Erythrozyten das mikroskopische Blutbild nicht mehr stört, sind selbst vereinzelte Trypanosomen mit Leichtigkeit zu diagnostizieren. SCHÖNBERG (1946) berichtet über Untersuchungen an Milchsedimenten mit Hilfe der Akridinorange-Methodik. Er kommt zum Schluß, daß das Akridinorange-Verfahren zur Zellanalyse in Milchsedimenten

auch für diagnostische Zwecke bestens empfohlen werden kann. Euterentzündungserreger können im Milchsediment durch eine Vitalfluorochromierung mit einem Gemisch von Akridingelb und Akridinorange unter Hinzufügung von Wasserblau nach SCHÖNBERG vorteilhaft beobachtet werden.

Ad 2. Das Problem der fluoreszenzmikroskopischen Unterscheidung lebender und toter Bakterienzellen mit Hilfe der Akridinorange-Fluorochromierung wurde von mir und meinen Schülern durch 6 Jahre hindurch bearbeitet. Es hat sich gezeigt, daß diese Unterscheidungsfluorochromierung in ihrer Exaktheit sowohl von physiologischen als auch von zytologischen Faktoren beeinflußt wird. Es mußten daher folgende Fragen geklärt werden. Um exakt bei einer Bakterienaufschwemmung lebende und tote Protoplasten fluoreszenzmikroskopisch zu unterscheiden, ist die wichtigste Voraussetzung das Vorhandensein eines Akridinorange-Überschusses. Es wird daher nicht im Tropfen am Objektträger eingefärbt, sondern die Einfärbung des Bakterienmaterials erfolgt in einem kleinen Röhrchen in 1—2 ccm Akridinorange-Lösung, wobei darauf geachtet werden muß, daß nicht zuviel Bakterienmaterial suspendiert wird. Die Färbedauer beträgt etwa $^1/_2$ Minute. Dann wird aus der Farbstoff-Bakterien-Suspension eine Öse entnommen und damit ein Deckglaspräparat hergestellt.

Eine exakte Unterscheidung lebender und toter Bakterienzellen ist mit dieser Methode nur möglich, wenn die Forderung erfüllt ist, daß weder das Lösungsmittel noch der gelöste Farbstoff innerhalb der vorgesehenen Untersuchungszeit von etwa 10 Minuten irgendeine sekundäre Giftwirkung auf die suspendierten Bakterien entfaltet. Dieser grundsätzlichen Frage mußte ich sehr viele mühevolle Untersuchungen widmen. Methodisch wurden die diesbezüglichen Versuchsreihen so durchgeführt, daß bei wechselndem Lösungsmittel und bei wechselnder Akridinorange-Konzentration Zählungen des Prozentsatzes der lebenden und toten Keime mit dem Zählokular vorgenommen wurden. Diese Zählungen wurden von derselben Färbeprobe alle 5—10 Minuten wiederholt und auf eine Stunde ausgedehnt. Die kurvenmäßige Darstellung in Abb. 4 zeigt ein Beispiel. Bleibt der Prozentsatz lebender und toter Keime von Anfang an annähernd konstant, so ist weder das Lösungsmittel noch der Farbstoff von schädigendem Einfluß. Steigt aber allmählich die Zahl der gezählten toten Keime an, so liegt eine Intoxikation der Bakterien vor. Ist innerhalb der ersten 10 Minuten das Verhältnis lebender zu toten Keimen annähernd konstant, so sind die exakten Milieuvoraussetzungen für die Durchführung der Unterscheidungsfluorochromierung mit Akridinorange gegeben. Es hat sich gezeigt, daß für die pathogenen Formen eine physiologische Kochsalzlösung, hergestellt in doppelt destilliertem Wasser, das geeignetste Lösungsmittel für den Farbstoff darstellt. Was die Giftwirkung des Akridinorange an sich anbelangt, so konnte im allgemeinen beobachtet werden, daß eine Akridinorange-Lösung 1 10.000 innerhalb der ersten 15 Minuten bei den allermeisten, im Laboratorium gebräuchlichen Bakterienformen keine Vergiftung hervorzurufen imstande ist. Stärkere Konzentrationen vermögen allerdings Giftwirkungen zu entfalten.

Nicht nur diese physiologischen Bedingungen sind für das Gelingen einer exakten Unterscheidungsfluorochromierung maßgeblich, sondern auch zytologische Konstellationen, welche die Struktur der Bakterienzelle betreffen, spielen dabei eine Rolle. Es hat sich gezeigt, daß Bakterienformen, welche eine sehr dünne und zarte Zellmembran besitzen, deren Zellen also im wesentlichen aus Protoplasmasubstanz bestehen, zu exakten Untersuchungen lebender und toter Keime mittels der Akridinorange-Methode am besten geeignet sind. Die zarten Zellmembranen sind so dünn, daß ihre kupferrote Fluoreszenz gegenüber der Grünfluoreszenz des lebenden Protoplasten nicht störend ins Gewicht fallen kann. Sind solche Bakterien tot, so werden die Protoplasten leuchtend kupferrot fluorochromiert. Der Gegensatz zwischen lebenden und toten Formen ist im Fluoreszenzbild extrem. Zu diesem Kreis der Bakterienformen gehören alle GRAM-negativen Bakterien und Bact. tuberculosis.

Es gibt aber zahlreiche Bakterientypen, deren Zellen mit einer derben, oft verschleimenden Membran umgeben sind und deren Protoplasmamasse im Verhältnis zur Membransubstanz recht klein ist. Werden solche Formen mit Akridinorange fluorochromiert, so färbt sich naturgemäß die derbere Membran auf Grund ihrer elektrischen Eigenschaften in greller kupferroter Fluoreszenzfarbe an. Der grün fluorochromierte Protoplast wird von der rot fluoreszierenden Membran völlig überstrahlt, so daß mit Hilfe der einfachen Akridinorange-Fluorochromierung eine exakte Unterscheidung zwischen lebenden und toten Protoplasten auf Grund dieser zytologischen Konstellation nicht mehr möglich erscheint. Mit Hilfe einer Nachbehandlung mit dem sehr grob dispersen Farbstoff Wasserblau, welcher zwar wohl in die Membran lebender Bakterien einzudringen vermag, der aber nicht in das Protoplasma permeieren kann, ist es möglich, die rote Membranfluoreszenz dieser Bakterienformen elektiv auszulöschen. Dann kommt die grüne Plasmafluoreszenz klar hervor. Es besteht also mit Hilfe der Nachbehandlung mit stark verdünnten Wasserblaulösungen an solchen Bakterienformen ebenfalls die Möglichkeit, die Plasmafluoreszenz lebender und toter Bakterien zu untersuchen. Zu diesen Formen gehören fast alle kleineren GRAM-positiven Kokken und Stäbchen. Insbesondere die Mikrokokken zeigen generell das oben beschriebene Verhalten.

Abschließend kann gesagt werden, daß bei medizinisch wichtigen Bakterienformen (alle GRAM-negativen Formen und Bact. tuberculosis) die fluoroskopische Unterscheidung lebender und toter Keime heute methodisch einwandfrei möglich erscheint (vgl. auch GÄRTNER 1943 und STICKL und GÄRTNER 1943).

III. Die Fluoroskopie der Bodenbakterien

Die Mikrobiologische Bodenforschung kann zur Untersuchung der Bodenbakterien zwei methodische Wege einschlagen.

1. Mit Hilfe von beimpften Kulturplatten werden die Mikroorganismen aus dem Boden herausgezüchtet und beschrieben. Alle bisherigen Ergebnisse

unter www.biologiezentrum.at

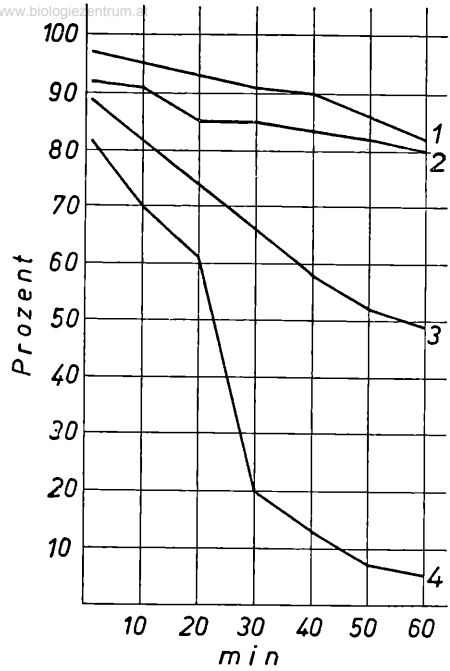

Abb. 4. Bacterium coli in Akridinorange 1 10.000 in verschiedenen Medien gelöst. I. Physiologische Kochsalzlösung, Aqua bidest. II. Nährbouillon. III. Physiologische Kochsalzlösung, Aqua dest. IV Aqua bidest. Von 10 zu 10 Minuten wurden die Zählungen an den fluorochromierten Coli-Suspensionen durchgeführt. Dargestellt ist in den Kurven der Prozentsatz der protoplasmatisch grün fluoreszierenden Coli-Bakterien, also der lebenden Coli-Zellen.

der mikrobiologischen Bodenforschung fußen im wesentlichen auf dieser Plattenmethode. Dieses Verfahren gestattet keine Aussage über den autochthonen Zustand der Bodenbakterien. Zur Zählung des Bakteriengehaltes der Böden hat man sich ebenfalls dieser Kulturplattenmethode bedient. Die erhaltenen Ergebnisse sind aber insofern zweifelhaft, als nicht alle aufgeimpften Bodenkeime auf den gebotenen Spezialnährböden anwachsen und zählbare Kolonien liefern. Es ist schlechterdings unmöglich, für alle physiologischen Ansprüche der im Boden wohnenden Mikroorganismen geeignete Nährböden zu finden, so daß das Plattenzählverfahren immer viel niedrigere Werte liefern muß.

2. Schon CONN (1918, 1929) und WINOGRADSKY (1925, 1928) waren bestrebt, die Bakterien im Erdboden durch eine direkte mikroskopische Untersuchung gefärbter Bodenausstriche zu beobachten. Diese Methode brachte aber bisher nur wenig Erfolg, da mit Hilfe der üblichen Färbemethoden die Bakterien und Erdteilchen sich in derselben Farbe färben und somit im Ausstrichpräparat nur in den günstigsten Fällen differenziert werden können. Es besteht kein Zweifel, daß die direkte mikroskopische Untersuchung der autochthonen Bodenbakterienflora in Bodenproben ein sehr erstrebenswertes Ziel der mikrobiologischen Bodenforschung darstellt, welches bisher aus technischen Gründen nicht erreicht werden konnte.

In den weiteren Ausführungen soll ein neuer Weg der fluoroskopischen Lebenddarstellung der Bodenbakterien mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Akridinorange mitgeteilt werden, welcher es gestattet, die autochthone Bakterienflora des Bodens mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes zu analysieren.

Nachdem durch STRUGGER (1940) die Akridinorange-Vitalfärbung in die Biologie eingeführt wurde, konnte ich mit meiner Mitarbeiterin Frau Dr. ROUSCHAL (1943) zum ersten Mal darlegen, daß in Bodenaufschwemmungen, welche mit einer Akridinorange-Lösung 1 2000 im Überschuß eingefärbt wurden, durch fluoreszenzmikroskopische Beobachtung die autochthonen Bodenbakterien klar differenziert werden können. Die lebenden autochthonen Bodenbakterien werden durch das Akridinorange in grüner Fluoreszenzfarbe fluorochromiert, während die mit Humusschichten überzogenen Bodenteilchen in kupferroter Fluoreszenzfarbe leuchten.

Färbt man eine Bodensuspension mit einer Akridinorange-Lösung 1 2000, hergestellt in Leitungswasser, 10 Minuten lang an, so wird der größte Teil des gelösten Farbstoffes vom Boden adsorbiert. Die Humusbestandteile des Bodens sind elektronegativ geladen und vermögen die Akridinorange-Kationen auf elektroadsorptivem Wege besonders stark zu speichern. Die Folge davon ist, daß alle Humusteilchen und alle Bodenteilchen, welche mit einer Humusschicht überzogen sind, bei Betrachtung der eingefärbten Bodensuspension unter dem Fluoreszenzmikroskop in kupferroter Fluoreszenzfarbe leuchten. Die auf den Humusteilchen und Humusschichten lebenden Bodenbakterien dagegen vermögen das Akridinorange nur in geringer Konzentration intravital zu speichern, so daß sie leuchtend grün fluoreszieren. So ist es möglich, an Böden, welche mit Akridinorange eingefärbt wurden, unter dem Fluoreszenzmikroskop die grün leuchtenden, lebenden Bakterienzellen auf dem roten Untergrund der Bodenteilchen in deutlich wahrnehmbarem Kontrast zu beobachten.

Die Technik der Einfärbung von Bodenproben wird folgendermaßen durchgeführt. In 5 Reagenzgläser wird je 1 g Frischgewicht des gesiebten Bodens eingefüllt. Hierauf wird jedes Reagenzglas mit 10 ccm einer Akridinorange-Lösung (Lösungsmittel Leitungswasser) versetzt und kräftig geschüttelt. Da das Adsorptionsvermögen verschiedener Bodenarten für den Farbstoff verschieden groß sein kann, wird durch diesen Vorgang ein und dieselbe Bodenprobe in 5 verschiedenen Konzentrationsstufen eingefärbt (1 1000, 1 2000, 1 3000, 1 4000, 1 5000). Auf diese Weise kann empirisch die zur Einfärbung des Bodens geeignetste Farbstoffkonzentration ermittelt werden. Ist die Farbstoffkonzentration zu niedrig gewählt, so wird die Farblösung innerhalb weniger Minuten nach dem Durchschütteln total entfärbt und die Humusbestandteile des Bodens färben sich nicht genügend rot an. Ist die Farbstoffkonzentration für den betreffenden Boden zu hoch, so bleibt ein zu starker Farbstoffüberschuß in der Lösung, welcher die Beobachtung stört. Die geeignetste Farbstoffkonzentration wird dadurch festgestellt, daß nach kräftigem Durchschütteln der Bodensuspension gerade noch ein geringer Farbstoffüberschuß in der Lösung verbleibt. Je nach dem Humusgehalt des Bodens

wird sonach die geeignetste Akridinorange-Konzentration höher oder tiefer liegen.

Die Herstellung der mikroskopischen Präparate kann auf zweierlei Weise vorgenommen werden.

1. Zur qualitativen Analyse der autochthonen Bodenbakterienflora wird zweckmäßigerweise die eingefärbte Bodensuspension kräftig abzentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird abgegossen, und eine geringe Menge des Bodensedimentes wird auf einem Objektträger mit Hilfe der Platinöse in einem kleinen Tropfen Paraffinöl verrieben. Dadurch gelangen viele Bodenteilchen in das Paraffinöl und können unter dem Fluoreszenzmikroskop nach Deckglasabschluß in optisch vorteilhaftester Weise beobachtet werden.

2. Für quantitative Untersuchungen sowie zur Beurteilung der frei im Bodenwasser lebenden Keime wird aus der eingefärbten Bodensuspension nach kräftigem Aufschütteln mit der Impföse ein kleiner Tropfen entnommen, auf einen Objektträger aufgesetzt und mit einem Deckglas bedeckt. Der geringe überschüssige Farbstoff stört im allgemeinen in dünner Schicht die fluoreszenzmikroskopische Beobachtung der Bakterien nicht.

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung selbst muß mit einem sehr lichtstarken Blaulicht-Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe einer Ölimmersion durchgeführt werden. Die von REICHERT gebaute große fluoreszenzmikroskopische Apparatur ist bereits für Blaulicht-Fluoreszenzmikroskopie ausgestattet. Die fluoreszenzfreie Immersion 100fach von REICHERT hat sich für solche Untersuchungen bestens bewährt. Für Zählungen benutzten wir eine Zählkammer von 20 μ Tiefe in Verbindung mit einem EHRLICHschen Zählokular. Unter Berücksichtigung der Verdünnung des Bodens beim Einfärben und des Bodengewichtes läßt sich eine quantitative Auswertung der Zählungsergebnisse durchführen.

In einem richtig hergestellten Präparat erscheinen die mit Humus überzogenen Bodenteilchen und Humuskrümel kupferrot und die auf den Bodenteilchen sitzenden Bodenbakterien leuchtend grün. Werden die Bodenbakterien vor der Färbung durch geeignete Abtötungsmaßnahmen zum Absterben gebracht, so sind keine grün gefärbten Gebilde auf den rot gefärbten Bodenteilchen mehr zu erkennen.

Unsere Versuche haben gezeigt, daß die vital gefärbten Bodenbakterien in Mikrokulturen auch weiterwachsen können. Sie ändern in der künstlichen Kultur in der Regel ihre Größe und Gestalt. Die Mikrokulturversuche ergaben den sicheren Beweis, daß die beobachteten grünen kokken- und stäbchenförmigen Gebilde lebende Bakterien darstellen.

Die Ergebnisse unserer bisherigen bodenmikrobiologischen Untersuchungen mit der fluoroskopischen Methode sind folgende:

Die Hauptmasse der Bodenbakterien sitzt auf den Humusschichten der Bodenteilchen. Die Bakterienzellen sind entweder einzeln verstreut oder in bakterienreicheren Böden zu zooglöaförmigen Kolonien vereinigt. Nur ein geringer Prozentsatz der Bodenbakterien lebt im Bodenwasser frei. Die größte Überraschung war die Tatsache, daß die autochthonen Bodenbakterien so

klein sind, daß sie mit den besten Objektiven oft gerade noch gesehen werden können. Ihre Größenordnung liegt zwischen 0,3 und 1 μ. Die durch nachträgliches Herauskultivieren gefundenen Formen sind wesentlich größer und lassen sich nicht ohne weiteres mit den autochthon vorkommenden Formen identifizieren. Bezüglich des Lebenszustandes der autochthonen Bodenbakterien kann berichtet werden, daß die Hauptmasse der Bodenbakterien in einem normalen Boden zweifellos lebend ist. Tote Bakterien konnten wir im Boden in großer Zahl nur unter ungünstigen Verhältnissen finden (ausgetrocknete Böden u. a.). Durch zahlreiche Zählungen konnte ermittelt werden, daß je nach der Bodenart in 1 g Trockenboden 500 Millionen bis 10 Milliarden Bakterienzellen exakt nachweisbar waren. Die folgende Tabelle gibt einige Zählungsergebnisse wieder.

Bodenart	Tiefe der Zählkammer in mm	Wassergehalt pro 1 g Frischerde in Prozent	Gesamtmittel der gezählten Bakterien pro Gesichtsfeld	Abgerundete Bakterienzahl bezogen auf das Trockengewicht	Abgerundete Bakterienzahl pro 1 g Erde bezogen auf das Frischgewicht	Statist. Wert für die Zooglöenanzahl pro 10 Gesichtsfelder
Gartenerde, Oberflächenprobe	0,02	—	11,2	—	3.900,000.000	—
Gartenerde, Oberflächenprobe	0,02	13,8	13,6	5.640,000.000	4.860,000.000	—
Gartenerde, Oberflächenprobe	0,05	12,9	26,4	4.347,000 000	3.786,000.000	1,6
Gartenerde, Oberflächenprobe wie oben, aber 24 Stunden bei 36° C	0,05	1,5	14,13	2.012,000.000	1 982,000.000	$^1/_3$
Gartenerde, Oberflächenprobe wie oben, aber 24 Stunden mit H_2O durchtränkt	0,05	32,2	21,6	4.571,000.000	3.099,000.000	$^9/_{10}$
Bester Wiesenboden, Oberflächenprobe	0,05	30,0	42,4	8.640,000.000	6.048,000.000	4,5
Heidesandboden, Oberflächenprobe	0,05	3,5	8,94	1.038,000.000	981,000.000	—

Interessant ist der überaus starke Einfluß der Trockenheit auf das Bakterienleben im Boden. Die Gartenerdeproben in der 4. und 5. waagerechten Spalte stammen von derselben Stelle und wurden verschieden vorbehandelt. Daraus ist zu erkennen, daß eine nur 24stündige Austrocknung des Bodens die Anzahl der lebenden Bakterien um ein beträchtliches Maß herabzusetzen vermag.

Unsere bisherigen Erfahrungen haben gezeigt, daß mit Hilfe der Akridinorange-Färbung und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Böden eine praktisch brauchbare, rasche Schätzung des Bakteriengehaltes der Böden durchgeführt werden kann.

Für die Landwirtschaft scheint mir die neue fluoroskopische Analyse der autochthonen Bodenbakterien von praktischer Bedeutung zu sein. Der Einfluß der verschiedenen Kultivierungs- und Düngungsmaßnahmen sowie der Einfluß klimatischer Faktoren auf die Bakterienflora des Bodens kann mit dieser Methode unmittelbar analysiert werden. Für das Studium der Rhizosphaere ist diese neue Methode besonders geeignet.

Literatur

Bachmann W., Über den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der Tuberkelbazillen und anderer Erreger. Münch. med. Wschr. **86** (1939), 16: 637.

— und *Finke L.,* Über die fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Tuberkelbazillen im Gewebe. Dtsch. med. Wschr. (1939): 1474.

Bukatsch F., Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Lebensvorgängen in der Pflanze, insbesondere der Zell- und Kernteilung. Z. ges. Naturwiss. (1940) 3/4.

— und *Haitinger M.,* Beiträge zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung des Zellinhaltes, insbesondere des Zytoplasmas und des Zellkernes. Protoplasma **39** (1940): 515.

Clauberg K. W., Über die Verwendbarkeit des Fluoreszenzmikroskopes in der bakteriologischen Praxis, zugleich über die Frage des Vorkommens virusartiger Mikroorganismen in menschlichem Krebsgewebe. Klin. Wschr. **18** (1939): 632.

Conn H. J., The microscopical study of bacteria and fungi in soil. N. Y. Agr. Cap. Stat. Geneva, Techn. Bull. **64** (1918).

Conn H. J., Use of the microscope in studying the activities of bacteria in soil. Journal Bact. **17** (1929): 339.

Dabelstein H., Das Fluoreszenzmikroskop in der laufenden Tuberkulosediagnostik. Zentralbl. Bakt., Parasitenkunde u. Infektionskrankh., I. Abt., **143** (1939), 3/4: 242.

Denzler B., Zur Analyse der Bakterienfluorochromierung. Dissertation. Hannover, 1942.

Didion H., Über den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Tuberkelbakterien. Klin. Wschr. (1939): 1315.

Gärtner K., Ein Beitrag zur Färbbarkeit der lebenden und toten Bakterienzelle. Z. Hyg. **125** (1943): 86.

Gram, Fortschr. Medizin (1884): 185.

Hagemann P., Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Leprabakterien im Nasenschleim und im Blut. Dtsch. med. Wschr. **63** (1937), 13: 514.

— Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über Virus und andere Mikroben. Zentralbl. Bakt., Parasitenkunde u. Infektionskrankh. **140** (1937): 184.

— Virus-Fluoreszenzmikroskopie. Münch. med. Wschr. **20** (1937): 761

Hagemann P., Fluoreszenzfärbung von Tuberkelbakterien mit Auramin. Münch. med. Wschr. (1938): 1066.
Haitinger M. und *Schwertner R.*, Beiträge zur Fluoreszenzmikroskopie in der Bakteriologie. Zentralbl. Bakt., Parasitenkunde u. Infektionskrankh., I. Orig., **145** (1939): 141.
Herrmann W., Der Nachweis von Tuberkelbazillen mit dem Fluoreszenzmikroskop. Dtsch. med. Wschr. **64** (1938): 1354.
Jung J. W., Kann die Fluoreszenzmikroskopie den Tierversuch beim Tuberkelbazillennachweis ersetzen? Dtsch. Tbk. Bl. (1940): 65—69.
Kölbel H., Untersuchungen über die quantitative Farbstoffspeicherung von Akridinorange in lebenden und toten Zellen und ihre Beziehung zu den elektrischen Verhältnissen der lebenden und toten Plasma-Eiweißkörper. Dissertation. Hannover, 1947.
Rihl H., Erfahrungen über den Tuberkelbazillennachweis mit dem Fluoreszenzmikroskop. Wr. klin. Wschr. (1940): 322—323.
Schallok G., Vereinfachter Nachweis von Tuberkelbazillen in histologischen Schnitten durch die Fluoreszenzmethode nach HAGEMANN. Münch. med. Wschr. (1940): 102—103.
Schönberg F., Zur Brauchbarkeit der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung des vitalgefärbten Milchsedimentes. Dtsch. tierärztl. Wschr. **53** (1946), 19/20: 147.
Stickl O. und *Gärtner K.*, Die Wirkungsweise der Sulfonamide und ihre chemotherapeutische Anwendung bei Ruhr. Z. Hyg. **125** (1943): 226.
Strugger S., Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. Jenaische Z. Naturwiss. **73** (1940): 97.
Strugger S., Neues über die Fluoreszenzfärbung toter und lebender Bakterien. Dtsch. tierärztl. Wschr. **50** (1942): 51.
— Ein neues Verfahren zur Färbung von Bakterien. Berl. u. Münch. tierärztl. Wschr. (1942) 33/34: 253.
— und *Hilbrich P.*, Die fluoreszenzmikroskopische Unterscheidung lebender und toter Bakterienzellen mit Hilfe der Akridinorange-Färbung. Dtsch. tierärztl. Wschr. (1942) 11/12: 121.
— Untersuchung über die vitale Fluorochromierung der Hefezelle. Flora **37** (1943): 73.
— Zum heutigen Stand der Akridinorange-Färbung lebender und toter Bakterien auch für die Milchuntersuchung. Z. Fleisch- u. Milchhyg. **54** (1943): 161.
— und *Rouschal Ch.*, Eine neue Methode zur Vitalbeobachtung der Mikroorganismen im Erdboden. Naturwiss. **31** (1943): 25/26.
— und *Rosenberger G.*, Vitalfärbung der Ziegenspermatozoen mit Akridinorange. Dtsch. tierärztl. Wschr. **49/50** (1944), und Dtsch. tierärztl. Rundschau **50/52** (1944).
— Die Fluorochromierung von Bakteriensporen mit Brillantsulfoflavin. Dtsch. tierärztl. Wschr. (1946) 19/20.
Weigert, Ber. Sitzg. Schles. Ges. vaterländ. Kultur. 10. 12. 1875.
Winogradsky S., Études sur la microbiologie du sol. I. Ann. Inst. Pasteur **39** (1925): 299.
— II. Ann. Inst. Pasteur **40** (1929): 445.
— Begriff der „autochthonen" Mikroorganismenflora. O. r. Acad. Sci. Paris, **187** (1928): 161.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Mikroskopie - Zentralblatt für Mikroskopische Forschung und Methodik

Jahr/Year: 1948

Band/Volume: 3

Autor(en)/Author(s): Strugger Siegfried

Artikel/Article: Der gegenwärtige Stand der Forschung auf dem Gebiet der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Bakterien / In Memoriam M. Haitinger. 23-38