



Schets der bacteriologische techniek

<https://hdl.handle.net/1874/234819>

mm 11388

Bn. 1093 VII 30 m. a.

SCHETS

DER

BACTERIOLOGISCHE TECHNIEK,

DOOR

PROF. DR. G. VAN OVERBEEK DE MEIJER.

(Niet in den handel.)



UTRECHT. — P. DEN BOER. — 1893.



SCHETS DER BACTERIOLOGISCHE TECHNIK.

I. Eenvoudig onderzoek onder den microscop.

- a.* — *De microscop* moet voorzien zijn van:
- α.* — een statief van middelbare grootte, met vrij groote voorwerpplaat.
 - β.* — een condensor volgens Abbe, te gebruiken met een platten, soms ook met een hollen spiegel.
 - γ.* — diaphragmata van verschillende grootte, maar beter nog een „iris-diaphragma, volgens Zeiss („Irisblende”).
 - δ.* — drie objectieven: een met *zwakke* vergrooting, doch *langen* brandpuntsafstand, bijv. Zeiss AA; — een objectief Zeiss F; een objectief voor *homogene* immersie, liefst een apochroomaat met compensatie-ocularen.
 - ε.* — ocularen Zeiss n°. 1, 3 en 4.
- b.* — *Dekglas-praeparaten.* — Daartoe zijn noodig:
- aa.* — dekglasjes van vierkanten vorm, 15 tot 18 mM. lang en breed (f 1.08—1.62 per 100).
 - bb.* — voorwerpglasjes, minstens 65×25 mM., met geslepen kanten (f 2.40 per 100).

Beide deze soorten van glasjes bewaren in glazen doozen of fleschjes, gevuld met alcohol. — Bij het gebruik zorgvuldig te reinigen en te drogen, en eene *zeer kleine* hoeveelheid der te onderzoeken stof gelijkmatig over de oppervlakte van een dekglasje te verdeelen met eene vooraf gegloeide platina-naald, of door het opleggen van een ander dekglasje over de oppervlakte van beide deze glasjes te verspreiden.

- c.* — *Onderzoek in een hangenden droppel*, die tegen verdroging beveiligd is.

Daartoe kunnen dienen voorwerpglasjes met:

- a.* — opgekitten glasing van 1 of 2 mM. hoogte (Böttcher) (f 0.48 per stuk), — of wel een rond gat van 1,5 mM. middellijn in het glasje, welk gat aan eene der beide vlakten van het voorwerpglasje gesloten wordt met een opgekit dekglasje.

Bruikbare kit, eene oplossing van schellak in spiritus, of, volgens Hansen: gelatine opgelost in azijn, waarbij op het tijdstip van gebruik fijn poeder van bichromas kalicus gevoegd wordt.

β . — uitgeslepen kom, formaat 55×32 mM. f 0.60 p. st.
of 87×37 „ 1.20 „ „

Bij het gebruik van α of β glaasjes moet de druppel *zeer klein* zijn, opdat tot aan het onderste gedeelte van den druppel goed onderzocht kunne worden.

Mocht de druppel te groot gemaakt zijn, dan kan men de fout verbeteren door het plaatsen van een klein stukje dekglas tegen het onderende van den druppel.

Het dekglasje, dat op het voorwerpglasje ligt, bevestigen met vaseline.

De zorg voor het maken van een zeer kleinen druppel valt zeer gemakkelijk bij het gebruik van:

γ . — voorwerpglasjes met ingeslepen *streepvormige* verdieping (f 1.60 per 10 stuks.)

δ . — idem met cirkelvormige groeve, een glasschijfje omschrijvend, dat $\frac{1}{10}$ mM. beneden de oppervlakte van het voorwerpglasje ligt. (Ranvier).

Bij het gebruik van γ of δ wordt de vochtlaag van zelf dun, zoodra het dekglasje is opgelegd. Dit doel kan echter ook bereikt worden door het gebruik van:

ϵ . — een glazen buisje van 20 cM. lengte, welks midden tot een platronc celletje van 2 mM. dikte geblazen en geplet is. De uiteinden van zoodanig buisje worden door propjes watten gesloten en het celletje wordt gesteriliseerd: door opzuiging wordt het daarna gevuld met eene zeer verdunde cultuur (volgens de Bary en Geissler's aanbeveling, gewijzigd door Brefeld).

Alle deze modellen van vochtige kamers, desgewenscht, in eene broedstoof te plaatsen; de druppel kan echter ook op eene *verwarmde* voorwerptafel onderzocht worden.

2°. **Kleurmiddelen.** Te onderscheiden in *zure* en *alcalische*.

a. — *Zure*: eosine, tropeoline, fluoresceïne, purpurine, safranine, picrinezuur en picraten. — Zij kleuren *alle* deelen der cel gelijkmatig.

b. — *Basische*: fuchsine, gentiana-violet, methyleenblauw, methylviolet, Bismarckbruin (synon. „vesuvine”). Zij kleuren de *kernen* der cel sterker dan hare overige deelen, en worden ook door bacteriën gretig opgenomen en dikwijls zeer sterk vastgehouden. — Moeten in verzadigde alcoholische oplossing bewaard worden, uitgezonderd Bismarckbruin (vesuvine), dat beter in poedervorm te bewaren is en bij het gebruik opge-

lost wordt in gelijke deelen water en glycerine, tot verzadiging toe. De andere, in verzadigde oplossing bewaarde, kleurstoffen bij het gebruik te verdunnen met water: 1 druppel der oplossing per 1 cM³ water.

Andere veel gebruikte, doch samengestelde, kleurmiddelen zijn:

α. — Ziehl's oplossing: 1 deel fuchsine, 5 deelen phenylzuur, 10 dln spiritus van 90°, in 100 gram water. Deze oplossing kleurt *alle* micro-organismen in enkele seconden, *zonder* verhitting, uitgezonderd *B. tuberculosis*. — Zij is echter niet te gebruiken in vochten, waarin bloed, etter, of andere eiwitachtige stof, omdat het phenylzuur deze stof zou doen stollen.

β. — Loeffler's oplossing: 30 cM³ verzadigde alcoholische oplossing van methyleenblauw in 100 cM³ eener oplossing van 10 mG KOH in 100 cM³ water.

γ. — Ehrlich's oplossing: 1 cM³ verzadigde oplossing van gentiana-violet in 10 cM³ aniline-water, dat telkens versch bereid wordt uit 3 druppels witte of stroogele (door het daglicht niet bruin gekleurde) aniline-olie in 6 tot 10 cM³ water; sterk schudden en filtreren.

δ. — Gram's oplossing: 1 deel jodium en 2 deelen KJ in 300 deelen water.

3°. Kleurwijzen.

a. — *Kleuring van bacteriën in vochten.* — Een dekglaspraeparaat maken (zie pag. 1, sub 1°, b.); dit drogen en daarna driemaal door eene donkere gasvlam halen. Volgens het dekglasje met de bestrekenen vlakke laten drijven op de gekozen kleurende oplossing, gedurende enkele minuten. Dan goed afspoelen in water, en met eene sterke vergrooing onderzoeken, — hetzij door het dekglasje nog vochtig op een voorwerpglasje te leggen, — hetzij door het eerst weder te drogen en daarna met Canada-balsem op een voorwerpglasje te kleven.

Ter besparing van tijd kan het door de vlam gehaalde praeparaat ook direct met een paar druppels sterk kleurvocht bedeed en na een paar minuten met een waterstraaltje afgespoeld worden (snelkleuring).

b. — *Kleuring ter beoordeeling, of de onderzochte micro-organismen al dan niet eene eigenbeweging vertoonen.* — De cultuur, of het verdachte vocht, uitstrijken op een voorwerpglasje, daarbij voegen een spoor eener oplossing van gentiana-violet, dadelijk een dekglasje opleggen, en bij sterke vergrooing onderzoeken.

c. — *Kleuring van zwermvibrionen* — volgens Löffler.

Daartoe is in de eerste plaats noodig eene oplossing van fuchsine in aniline-water, bereid uit 11 cM³ eener verzadigde alcoholische oplossing van fuchsine, 10 cM³ watervrijen alcohol, en 100 cM³ anilinewater (uit 30 druppels anilineolie per 100 cM³ water; sterk schudden en filtreeren), welk mengsel als *kleurmiddel* dient. In de tweede plaats een *bijtmiddel*, bereid uit 10 cM³ eener oplossing van 20 deelen acidum gallicum in 80 deelen water, met 5 cM³ eener *koud* verzadigde oplossing van sulphas ferrosus, en 1 cM³ eener alcoholische oplossing van fuchsine. Dit bijtmiddel moet echter *zuur* gemaakt worden bij alkali-vormende, en *alcalisch* bij zuur-vormende bacteriën; men heeft dus nog noodig hetzij eene 1 % oplossing van NaOH, hetzij eene 1 % oplossing van H₂SO₄.

Het bijtmiddel op zich zelf, zonder zuur of alkali, kleurt zeer goed de zwermdraden van Spirillum concentricum. Ter kleuring van de zwermdraden der cholera-bacillen moet 1 druppel der zwavelzuur-oplossing bij 32 cM³ van het bijtmiddel gevoegd worden. Voor typhus-bacillen is daarentegen eene toevoeging van 1 cM³ der soda-oplossing bij 16 cM³ van het bijtmiddel noodig. Voor B. subtilis 28 tot 30 druppels; voor de bacterie der septichaemie 36 tot 37 druppels.

Loeffler heeft aanbevolen zich in de toepassing dezer kleurwijze te oefenen op den B. cyanogenus, wiens zwermdraden kleurbaar zijn binnen zeer ruime grenzen, van 20 druppels zuuroplossing, tot 15 druppels alkali-oplossing per 16 M³ bijtmiddel. Men maakt daartoe een zeer dun dekglaspraeparaat en haalt dit door eene vlam zonder het al te sterk te verhitten; brengt daarna een druppel van het bijtmiddel op het praeparaat, met of zonder zuur- of alkali-oplossing, en verwarmt, totdat een weinig damp gevormd wordt, $\frac{1}{4}$ tot 1 minuut, terwijl het glaasje heen en weder bewogen wordt. Vervolgens afspoelen in water, dan in alcohol. Voorts een druppel toevoegen der verzadigde oplossing van fuchsine-aniline; andermaal verwarmen, totdat een lichte damp opstijgt; sterk afspoelen; drogen; insluiten in Canada-balsem.

Trenkmann ¹⁾ heeft de volgende handelwijze aanbevolen tot het kleuren van zwermdraden. Op een *voorwerp* glaasje brengt men 2 tot 3 druppels kiemvrij water en men verdeelt daarin een klein droppeltje der cultuur; daarvan brengt men

¹⁾ S. L. Schenk, Grundriss der Bakteriologie. Wien u. Leipzig, Urban en Schwarzenberg, 1893, p. 50.

een droppeltje over op een dekglasje, spreidt goed uit, droogt aan de lucht, en legt het glaasje, *zonder het te verhitten*, in een mengsel van 2 deelen tannine en $\frac{1}{2}$ deel zoutzuur in 100 deelen water, gedurende 6 tot 12 uren. Daarna afspoelen in water; vervolgens gedurende 1 uur in jodiumwater; weder afspoelen; eindelijk gedurende $\frac{1}{2}$ uur in eene zwakke oplossing van gentiana-violet-anilinewater (zie bladz. 3, sub γ).

d. — *Kleuring van sporae*. — Een dekglaspraeparaat drogen en driemaal door de vlam halen. Daarna een uur laten drijven op eene *warne* oplossing van fuchsine-aniline (5 cm^3 verzadigde alcoholische oplossing van fuchsine in 100 cm^3 aniline-water versch bereid uit 30 droppels aniline-olie in 100 cm^3 water). Afspoelen in water. Ontkleuren in een mengsel van 25 cm^3 zoutzuur en 75 cm^3 alcohol. Vervolgens kleuren in eene verzadigde oplossing van methyleenblauw in water. Andermaal afspoelen in water. Drogen en insluiten. — Ter oefening zijn zeer geschikt: *B. subtilis* en vooral *B. megaterium*.

Snellere kleuring, volgens Möller. — Het dekglaspraeparaat 2 minuten in watervrijen alcohol, daarna 2 minuten in chloroform. Afspoelen in water. Voorts $\frac{1}{2}$ tot 2 minuten in eene 5% oplossing van chroomzuur. Andermaal afspoelen met water. Op het praeparaat droppelen eene oplossing van carbofuchsine in water (zie p. 3, sub α) en 1 minuut opkoken in de vlam. De carbofuchsine afgieten en het dekglasje ter ontkeuring in 5% oplossing van zwavelzuur. Andermaal goed afspoelen in water. Dan nog $\frac{1}{2}$ minuut in eene waterachtige oplossing van methyleenblauw of malachietgroen; nog eens afspoelen. De sporae zijn dan donkerrood in het binnenste der blauw (of groen) gekleurde bacterie.

e. — *Kleuring, volgens Gram*. — Het dekglasje gedurende 3 minuten op Ehrlich's oplossing laten drijven (gentiana-violet met aniline-water, zie p. 3, sub γ). Daarna, volgens Botkin, afspoelen *in aniline-water*. Het afgespoelde glaasje gedurende 3 minuten op Gram's oplossing (zie p. 3, sub δ) laten liggen, totdat het praeparaat zwart gekleurd is. Met watervrijen alcohol afwasschen, totdat volkomene ontkeuring verkregen is. Drogen. Insluiten in Canada-balsem.

Deze kleuringswijze is echter niet geschikt voor *alle* bacteriën: cholera-, typhus-, kwade-droes-bacillen, *B^m coli commune*, Gonokokken, Recurrens-spirillen, en nog enkele andere bacteriën behouden de kleurstof *niet*; deze eigenschap kan dus een kostelijk hulpmiddel zijn ter onderscheiding van

eenige bacteriën-soorten onderling. — De kleuring volgens Gram gelukt overigens niet met *alle* kleurmiddelen: fuchsine, methyleenblauw en Bismarckbruin zijn niet bruikbaar (Unna); de kleuring gelukt alleen met de pararosanilinen: *methylviolet*, *gentianaviolet* en *victoriablauw*.

f. — *Kleuring van B. tuberculosis*, volgens Ziehl-Neelsen. — Gedurende 3 minuten het dekglasje laten drijven op eene verwarmde oplossing volgens Ziehl (fuchsine en phenylzuur, zie p. 3, sub. *a*); daarna gedurende slechts enkele seconden in 1 HNO_3 (of H_2SO_4) en 3 water; vervolgens ontkleuren in spiritus van 60%, totdat de tint niet meer dan rooskleurig is; dan al het zuur afspoelen met veel water; nogmaals kleuren gedurende enkele minuten in eene verzadigde oplossing van methyleenblauw in water; eindelijk afspoelen in water en het glaasje drogen; op het gekleurde praeparaat een druppel xylol; ten slotte insluiten in Canada-balsem.

Snellere kleuring, volgens Gabbe's wijziging, waardoor het ontkleuren door zuur en het herkleuren met methyleenblauw gelijktijdig verkregen kunnen worden: na de eerste kleuring volgens Ziehl-Neelsen, het glaasje gedurende slechts ééne minuut in eene oplossing van 2 deelen methyleenblauw in 1 deel H_2SO_4 en 3 deelen water. Vervolgens afspoelen in water, drogen, enz., als boven.

g. — *Kleuring van weefsel-doorsneden*. — De weefseldeelen, waarvan doorsneden onderzocht moeten worden, plaatsen in stopfleschjes, op wier bodem eene laag zuivere watten gelegd is en die nagenoeg geheel gevuld zijn met watervrijen alcohol; in dit vocht moeten de weefseldeelen 1 tot 2 etmalen blijven liggen om goed hard te worden. Daarna doorsneden maken met een microtome en de afgesneden dunne schijfjes opvangen in alcohol absolutus. De schijfjes vervolgens kleuren:

a. — Volgens Gram. — De schijfjes overbrengen in gentiana-violet met aniline-water en, na afspoeling in aniline-water, overbrengen in Gram's oplossing, geheel volgens pag. 5, sub *c*. — Het jodium vormt dan met de kleurende stof een nederslag, dat aan de aanwezige micro-organismen blijft kleven, doch uit de weefseldeelen gemakkelijk weggespoeld kan worden; na dat wegspoelen blijven alleen de bacteriën sterk gekleurd, donker violet, terwijl weefseldeelen, bloed, etter, enz., hoogstens eene lichtgele kleur vertoonen. Bij deze kleuring van weefsel-doorsneden moet het praeparaat, na de afspoeling in absoluten alcohol, gevolgd door droging, in xylol gelegd worden, waarin het na $\frac{1}{2}$ minuut reeds doorschijnend wordt. Daarna insluiten in Canada-balsem.

Men kan deze kleuringswijze ook verbinden met *kernkleuring*, bijv. door karmijn, waardoor eene zeer fraaie dubbelkleuring verkregen wordt.

β . — Volgens Frankel. — De weefseldoorsneden gedurende $\frac{1}{2}$ uur bewaren in eene sterke oplossing van picrocarmijn; afspoelen in spiritus van 50%. Daarna gedurende $\frac{1}{2}$ uur in eene *niet-verzadigde* oplossing van gentiana-violet in aniline-water (eenige druppels eener oplossing van 25 gram gentiana-violet in 100 gram watervrijen alcohol, in een horlogeglasje, waarin aniline-water uit 1 deel aniline-olie en 20 deelen water; dit aniline-water sterk schudden, 5 minuten laten bezinken, filtreeren door een vooraf bevochtigd filter; als het filtraat niet helder is, nogmaals schudden en filteren. Het mengsel van gentiana-violet en aniline-water moet ondoorzichtig geworden zijn.) — Het praeparaat vervolgens gedurende 3 minuten in de jodium-oplossing; dan in watervrijen alcohol, waarin de roode kleur weder te voorschijn komt, terwijl gelijktijdig het water onttrokken wordt. — Droging. — Even in xylol. — Insluiten in Canada-balsem.

h. — *Onderzoek van schimmels, hoofdzakelijk volgens O. Johan-Olsen.*

a. — Een praeparaat, geschikt tot onderzoek, maar niet ter bewaring, kan *snel* gemaakt worden op de volgende wijze. Een klein vlokje der schimmel-kolonie gedurende enkele minuten in verdunnen alcohol, daarna in eene zwakke ammonia-oplossing; het vocht wegzuigen met vloeipapier; afspoelen in water; insluiten in glycerine en onder den microscop brengen.

β . — *Duurzaam* praeparaat op dezelfde manier, doch kleuren met osmium-zuur. Daartoe in een goed sluitend, zorgvuldig met alcohol en aether uitgespoeld, bruin stopfleschje eene oplossing van 0,5% osmium-zuur gereed houden. Twee druppels dezer oplossing in een horlogeglasje, waarin 8 druppels water (= ongeveer 0,1% osmium-zuur); het schimmelvlokje daarin een dag laten liggen. Wil men de oplossing van osmium-zuur onverdund gebruiken, dan zijn enkele minuten voldoende. Vervolgens afspoelen in alcohol, dan in gedistilleerd water; blijft het praeparaat nog te zwart, zoo ontkleure men met eene zwakke ammoniak-oplossing; ten slotte afspoelen in water en insluiten in glycerine. — Na de aanwending van het osmium-zuur kan men het praeparaat ook kleuren, door het gedurende een vrij langen tijd in eene zeer verdunde oplossing van safranine te leggen.

γ . — Eene kolonie van een of ander schimmelplantje kan *in haar geheel* bewaard worden door haar voorzichtig over

te brengen op een voorwerpglaasje en daarop zachtken een dekglasje te plaatsen; door het drogen van het praeparaat kleeft het dekglasje spoedig vast. Aan den rand van het dekglasje brengt men dan eenige druppels eener oplossing van osmiumzuur 0,1% en aan den tegenovergestelden rand zuigt men dit vocht door het geheele praeparaat, door middel van vloeipapier. Na eenige minuten spoelt men op dezelfde wijze het osmiumzuur weg en laat daarna glycerine doortrekken; wil men kleuren, dan ga aan de aanwending van glycerine eene kleuring met safranine vooraf. — Wanneer het praeparaat niet bestemd is om bewaard te worden, kan men ook de sub *a* beschrevene snellere bereidingswijze toepassen.

i. — *Onderzoek van straalshimmels* (actinomyces). Wensch men alleen te onderzoeken, of straalshimmels aanwezig zijn in etter of eene weefseldoorsnede, dan behoeft men het praeparaat slechts te behandelen met azijnzuur of een alcali, en daarna in te sluiten in glycerine. — Wil men kleuren, dan is, volgens Fränkel, de toepassing van Gram's methode aan te bevelen: de weefseldoorsnede één etmaal in gentianaviolet-aniline-water, daarna gedurende $\frac{1}{4}$ uur in de jodiumoplossing.

II. Het maken van reinkweekingen.

Alle te gebruiken werktuigen moeten *zorgvuldig gereinigd* en *kiemvrij* zijn.

a. Werktuigen, zooals pincetten, scharen, haakjes, naaldjes, enz., kan men snel kiemvrij maken door gloeiing in eene spiritus- of donkere gasvlam. Maar zij lijden daardoor zeer; koken in water, of droge hitte van 150° C., zijn daarom te verkiezen. — *Glaswerk* kan sterk verhit, of wel door afspoeling en uitwassching met kiemvrij gedistilleerd water, daarna alcohol, en eindelijk aether, gesteriliseerd worden. Gemakkelijker is het blootstellen aan stoom van 100 tot 110° C., terwijl de halzen van flesschen, kolven, enz., door eene prop ontvette watten los gesloten zijn. — Platinanaalden in de vlam te gloeien. — Filtreerpapier, bestemd tot het inwikkelen van gesteriliseerde glasplaten, doozen, enz., het best in stoom van 100° C. te steriliseeren, in mijn oven; ook watten op dezelfde wijze te behandelen. Wil men droge heete lucht gebruiken, dan moeten het glaswerk, de watten, het filtreerpapier, enz., gedurende $\frac{1}{2}$ tot 1 uur, in eene koperen stoof (desnoods in een blikken beschuittrommel, volgens Salomonsen) daaraan blootgesteld worden.

Nieuw glaswerk (platen, doozen, buisjes, enz.) vóór de

sterilisatie 24 uren lang ondergedompeld houden in zwakke oplossing van ruw zoutzuur, tot het verwijderen van kali.

De gewoonlijk gebruikte, rood koperen, broedstoven hebben dubbele wanden, wier tusschenruimte gevuld is met lucht of water, naar gelang van den graad der gewenschte warmte. Zij zijn in onderscheidene grootten verkrijgbaar. Wanneer de stoven door gasvlammen verhit worden, is het gebruik van thermo-regulators — bijv. van Rohrbeck (eene wijziging van den thermo-regulator van Lothar Meyer), van Reichert, of van Bohr — onmisbaar ter verzekering van de gelijkmatigheid der temperatuur bij het broeden.

b. — *Vochten*, bestemd tot het kweken van micro-organismen.

a — *Vleeschnat*; 0,5 kg. fijn gehakt vleesch zonder vet, verdeelen in 1 liter water en 15 uren laten staan in eene ijskast; nu en dan omroeren. Uitpersen.

Of wel Liebig's vleeschextract, 5 gram oplossen in 1 liter water.

Cibil's extract, 5 tot 20 gram in 1 liter water.

Morris. » 5 » 20 » » 1 » »

Daarna bijvoeging van 1% pepton en 0,5% NaCl.

Tot het kweken van cholera-bacillen zijn 5 gram Cibil's of Morris' extract voldoende. Morris' extract verdient de voorkeur in elk geval, omdat het weinig zouten bevat.

Visch-bouillon. — Uit fijn gehakte verse zeevisch te bereiden, evenals vleeschnat.

Alle deze soorten van bouillon dadelijk na de bereiding $\frac{1}{4}$ uur koken in een bekglas, geplaatst in stroomenden stoom van 100° C. Na de koking carbonas natricus bijvoegen, totdat de reactie zeer zwak alcalisch is; mocht de reactie te sterk alcalisch zijn, dan verzwakken door het bijdroppen van acidum lacticum. Daarna andermaal koken, gedurende 20 minuten en laten bekoelen, opdat het vet en de bij hoogere warmte oplosbare zouten (die het vocht later, bij lagere warmtegraad, troebel zouden maken) worden uitgescheiden; ten slotte filtreren. — Indien bijvoeging van glycerine, glucose, enz., wordt verlangd, moet zij, even als die van NaCl. en pepton, geschieden vóór de eerste koking. (Pepton lost in koud water moeielijk op).

De bereide bouillon wordt dan overgeschonken in zorgvuldig gereinigde, doch niet vooraf gesteriliseerde, kolfjes van Pasteur, of van Erlenmeyer, of in reageerbuisjes; deze gevulde kolfjes of buisjes dan terstond steriliseeren in stoom van 110° C. gedurende 15 minuten. De wattenproppen daarna terstond bedekken met een *papieren* kapje; dit is

verkiezelijk boven het bedekken met een caoutchouc-kapje, omdat de wattenprop onder het papieren kapje *droger* blijft (schimmels kunnen in *droge* watten niet doorgroeien).

β. Andere cultuur-vochten: eene *pepton*-oplossing van 0,5 % sterkte; *hooi*-aftreksel; *moutextract* (zeer geschikt tot het kweken van *Mucor*-soorten); *fruimen*-afkooksel (vooral voor *Aspergillus*-soorten een goed kweekvocht); enz. — Tot het kweken van *schimmels* moeten de vochten neutraal of zwak zuur zijn.

Alle deze vochten kunnen ook *bij lagere warmtegraad* gesteriliseerd worden: vele micro-organismen groeien beter in *koud* gesteriliseerde vochten dan in warm gesteriliseerde. Het geschiedt door middel van Chamberland's bougies, of de veel dunnere (pijpensteel dikte) „*bougies-Roux*”; het vocht wordt daarbij opgevangen in kiemvrije glazen kolven. Vochten, die veel eiwitstoffen bevatten, worden echter niet gemakkelijk op deze wijze gesteriliseerd; zij verliezen veel eiwitstoffen, die op den buitenwand der bougie terugblijven, zoodat herhaalde reiniging dezer buitenvlakte noodzakelijk is.

c. — Vaste kweekbedden. — Robert Koch heeft in 1881 aanbevolen, een door bijvoeging van *gelatine* tot stolling gebracht kweekbed te verkiezen boven een kweekbed bestaande uit gekookte schijfjes of reepjes aardappel, omdat de *samenstelling* van het kweekbed dan naar verkiezing gewijzigd kan worden, en vooral omdat daardoor een *doorschijnend* kweekbed verkregen wordt, zoodat de cultuur tijdens hare ontwikkeling voortdurend onder den microscoop bij zwakke vergrooting onderzocht kan worden.

a. — De gebruikte *gelatine* moet zijn van de beste, witte soort, wier smeltpunt althans niet veel onder 20° C. ligt, wanneer op de aanvankelijk door Koch aanbevolen wijze op *drie* achtereenvolgende dagen het mengsel wordt opgekookt. Men kan echter het smeltpunt hooger houden door de volgende wijziging der bereiding. Bij den gereed gemaakten bouillon van vleesch, vleeschextract, of visch, voege men 10% gelatine, bij zachte verwarming 'ter bespoediging van het smelten; daarna andermaal zorgen voor eene zwak alcalische reactie, en filtreeren in een warmwater-trechter. — Wanneer het filtraat niet volkomen helder is, moet men het klaren met eiwit; het wit van één ei fijn knippen en vermengen met 100 gram water, welke hoeveelheid voldoende is ter klaring van 1 Liter gelatine-bouillon; deze eiwitoplossing vermengen met het filtraat, zonder schuim te maken, terwijl de temperatuur niet hooger zij dan 50° C.; vervolgens langzaam verwarmen, totdat het eiwit stolt; eindelijk

weder filtreeren. Dit filtraat wordt bij $\pm 105^{\circ}$ C. gekookt gedurende slechts 10 minuten, in kolfjes of buisjes, die zonder voorafgaande sterilisatie met watteproppen gesloten zijn; het mengsel behoudt dan zijne lichte kleur en vormt, na bekoeling, eene tamelijk vaste gelei, die tot $\pm 24^{\circ}$ C. verwarmd, resp. gebroed, kan worden zonder te smelten. Bij het overgieten van de vloeibare (nog warme) gelei, vóór de sterilisatie, moet een trechtertje gebruikt worden, opdat de gelei de halzen der kolfjes of buisjes niet kunne aanraken. Wil men de buisjes gebruiken tot het maken van streepculturen, dan worden zij na de sterilisatie schuins gelegd, met het boven-einde op eene houten liniaal van 2 cM. hoogte, ter afkoeling, en verkrijging van een vast kweekbed van zoo groot mogelijke lengte.

β . — Wordt een kweekbed verlangd, dat eene hoogere broedwarmte dan 24° C. verdragen kan, zonder te smelten, dan moet de bouillon, volgens Rob. Koch, met 1 tot 2% *agar-agar* vermengd worden, d. w. z. met eene stof, die uit oost-indische en japansche algen verkregen wordt en in lange dunne, doorschijnende reepen, of in lange sponsachtige prismen, of in poedervorm in den handel is. De reepen of stangen moeten vóór het gebruik afgewasschen worden in koud water, ter verwijdering van het aanhangende vuil. De verdere bereiding van agar-agarbouillon geschiedt op dezelfde wijze, als die van gelatine-bouillon, doch men moet den bouillon alcalisch maken, alvorens daarbij agar-agar gemengd wordt, omdat deze stof in *zuur* vocht in suiker zou worden omgezet; de warmtegraad bij het smelten en filtreeren moet ook veel hooger zijn, dan bij gelatine, omdat agar-agar eerst bij 90° C. volkomen smelt. Het smelten geschiedt het snelst door stoom in den steriliseeroven bij 100° C.; evenzoo het filtreeren.

Groote voordeelen van het gebruik van agar-agar zijn, dat: 1° bij 30 tot 40° C., en zelfs bij nog hooger warmtegraad, kan worden gebroed, zonder dat de cultuur vervloeit, — 2°. de cultuur zich ontwikkelt, zonder vervloeiing van het kweekbed, — 3°. bij het ontbreken van een steriliseeroven voor stoom onder hoogere drukking, het koken van het mengsel langer duren kan en menigvuldiger herhaald kan worden, dan bij het bereiden van gelatine-bouillon, omdat het geleivormend vermogen van agar-agar daarbij niet lijdt. — Na-deelen zijn daarentegen, dat: 1°. de eigenaardige kenmerken der groeiwijze van vele bacteriën-soorten op een vast kweekbed over het algemeen veel talrijker en duidelijker zijn op een gelatine-, dan op een agar-agar-kweekbed, 2°. de berei-

ding van agar-agar-bouillon, inzonderheid het filtreren, veel meer tijd vordert, dan die van gelatine-bouillon, — 3°. plaat-culturen gemakkelijker vallen bij het gebruik van gelatine-, dan bij dat van agar-agar-bouillon.

γ. — De laatstgenoemde nadeelen worden zeer verminderd door het *vermengen* van *gelatine* en *agar-agar* in bepaalde verhouding tot de gebruikte hoeveelheid bouillon, volgens Jensen, en wel 5% gelatine en 0,75% agar-agar. Dit mengsel moet 20 minuten gekookt worden en daarna gefiltreerd in Erlenmeier's kolfjes; deze kolfjes zijn vooraf voorzien van 1 tot 2 cM³ water, een trechter met bevochtigd filter, en een goed sluitend dekglas, opdat het filter vochtig blijve; bij het begin der filtratie wordt dan het water uit het kolfje verwijderd, het heete mengsel in het filter uitgeschonken, en de geheele toestel terstond met een bolvormig, met de bolle vlakte naar beneden gekeerd, dekglas voorzien en in den steriliseeroven bij 100° C. geplaatst. Wanneer het op deze wijze verkregene filtraat volkomen helder is, worde het door koking gedurende 30 minuten bij 100° C., of gedurende 10 minuten bij 110° C., gesteriliseerd. — Dit kweekbed blijft vast bij 30 tot 40° C. en is uitmuntend geschikt tot het kweken van vele bacteriën-soorten, onder anderen de phosphoresceerende.

δ. — Zoowel de gelatine-, als de agar-agar-kweekbedden worden niet zelden nog met andere stoffen vermengd, ter bevordering van de ontwikkeling en vermenigvuldiging van zekere micro-organismen.

Ter kweeking van tuberkelbacillen, bijv., is de door Roux en Nocard aanbevolene bijvoeging van 5% glycerine bij agar-agar-bouillon zeer gewenscht.

Micrococcus agilis (Ch. Ali Cohen) groeit zeer goed op gelatine-bouillon, vermengd met 5% glucose. — Het bijmengen van 5% glycerine, 1% glucose, 1% pepton, 0,5% NaCl., en 1 tot 1 1/4% agar-agar bij bouillon levert een vast kweekbed, waarop bijna alle bacteriën zeer gemakkelijk groeien met behoud hunner eigene kenmerken. — Een mengsel van gelijke deelen moutextract en water, met 1,5% agar, verschaft een kweekbed, zeer geschikt voor de ontwikkeling van gistsoorten, saccharomyceten.

ε. — Ook het tot stolling gebrachte *serum* van menschen-, runder-, paardenbloed — *niet* van *schapenbloed*! — is zeer dienstig tot het kweken van vele, bepaaldelijk *pathogene*, soorten van micro-organismen. Ter bereiding van zoodanig kweekbed, volgens de oorspronkelijk door Rob. Koch aanbevolene methode, moet het bloed opgevangen worden in

een hoog cilinderglas en daarin 48 uren in eene ijskast rustig blijven. Het gele, of zeer bleek roodgekleurde bovendrijvende serum wordt daarna door middel van eene gesteriliseerde pipette overgebracht in gewone cultuurbuisjes; deze buisjes worden 8 dagen achtereen, telkens 2 uren per dag, verwarmd tot 56° C. in eene platte, met water in den dubbelen wand voorziene broedstoof, wier bodem eene passende helling heeft ter voorkoming van het doordringen der nog vloeibare bloedwei tot in de wattenprop; de stoof is gesloten door eene glasplaat bedekt met vilt, en wordt vervaardigd meestal uit vertind staal met koperen bodem. Na deze „gefractioneerde sterilisatie” worden de buisjes in de stoof gedurende ongeveer $\frac{1}{2}$ uur verhit tot 68 à 70° C., zoodat het serum in de schuinse ligging stremt. — Gemakkelijker is echter de bereiding door het bijvoegen van *chloroform* bij het uit het cilinderglas in een kiemvrij *kolfje* overgebrachte serum, in welken toestand het gedurende vele dagen kiemvrij en vloeibaar bewaard kan worden, mits de verdamping van den chloroform belet zij; wil men daarentegen *buisjes* met dat serum vullen, dan bewaart men het met chloroform vermengde vloeibare serum slechts gedurende enkele dagen in de geslotene kolf en giete men het vocht daarna voorzichtig over in de vooraf gesteriliseerde buisjes, die vervolgens in de bovenvermelde broedstoof op den schuinliggenden metalen bodem geplaatst worden, gesloten door wattenproppen; door zachte, *langzaam* stijgende verhitting wordt de chloroform vervolgens uitgedreven en het serum wordt ten slotte door verhitting tot 70° C. gestremd.

Naar beide bereidingswijzen verkrijgt men een zeer geschikt geleiachtig en geelbruin gekleurd vast kweekbed. De gevulde buisjes moeten echter, met een caoutchouckapje gedekt, nog gedurende 3 dagen in eene broedstoof bij 37° C. geplaatst worden, opdat blijke, dat zij kiemvrij zijn.

Veel sneller leidt de *koude* sterilisatie tot het doel, d. w. z. het filtreeren van het bloedserum door eene Chamberland-bougie onder hoogere drukking, doch men verliest dan tamelijk veel der eiwitachtige stoffen (zie boven, pag 10) en men verkrijgt bij de stremming een witgrijs, *ondoorzichtig* kweekbed.

Ook het bloedserum kan tot bijzondere doeleinden met andere stoffen vermengd worden. Bij voorbeeld: tot het kweken van *tuberkelbacillen* is de bijvoeging nuttig van 6 tot 8% glycerine, waarna bij 75 tot 78° C. gestremd wordt. — Tot het kweken van *diphtheriebacillen* heeft Löffler een mengsel aanbevolen van 3 deelen serum, met

1 deel *neutralen* bouillon (waarin 1% pepton, 1% glucose, en 0,5% NaCl); daarna volgt op de gewone wijze de gefractioneerde sterilisatie en ten slotte de stremming bij 66° C. — Op raad van Ferd. Hüppe wordt in den laatsten tijd ook veel gebruik gemaakt van bloedserum met gelatine of met 2% agar-agar, die resp. door gefractioneerde sterilisatie kiemvrij gemaakt worden.

ξ — Zeer dikwijls worden bacteriën ook gekweekt op stukken, of schijfjes, *aardappel* en *koolraap*, die in dubbele schaalpjes met overvallend deksel (Petri), of in glasdoozen (Soyka), of wel in glazen buisjes met geringe vernauwing even boven den bodem (Roux), of eenvoudig in glazen buisjes met een wattenpropje op den bodem (Hüppe) gelegd en daarna gedurende $\frac{3}{4}$ uur gekookt, of in stoom onder hoogere spanning bij 107 tot 110° C. gedurende $\frac{1}{4}$ uur gesteriliseerd zijn. *Sterilisatie der schaalpjes, doozen, enz., vóór de vulling, is overbodig.* — De aardappelen of koolrapen behoeven eenvoudig van het aanhangende vuil gereinigd te worden, door afborsteling in koud water; daarna worden door middel van eene koperen kurkboor lange cilinders uitgeboord, ter halve lengte van een reageerbuisje; kleine steenen worden uitgesneden, indien zij aanwezig zijn; de cilinders van koolrapen worden in hun geheel gebruikt, die van aardappelen daarentegen in de diagonaal overlangs doorgesneden ter verkrijging van een langwerpige en effen kweekbed. — De koolrapen zijn een uitnemend kweekbed voor schimmels; de aardappelen voor zeer vele soorten van bacteriën.

γ. — Tot het kweken van *schimmels* kan men zich ook bedienen van poeder van broodkruim, die met water, bouillon, enz., tot eene pap gemaakt en in dubbele glazen schaalpjes, of in kolfjes, gesteriliseerd wordt. — Soyka heeft ook een kweekbed aanbevolen, samengesteld uit 10 gram rijstpoeder, 15 gram melk en 5 cM³ neutralen bouillon.

De *scheikundige reactie* van alle bovengenoemde vochten en vaste kweekbedden moet beantwoorden aan de soort der gekweekte bacteriën. Meestal is eene zwak alkalische reactie de het meest gewenschte. Voor enkele soorten, bijv. cholera-bacillen, moet de reactie daarentegen iets sterker alkalisch zijn; tot het kweken van *schimmels* is een *zwak zuur* kweekbed meestal geschikter, dan een neutraal of zwak alkalisch.

Het *afnemen* van kiemen en het uitzaaien of overenten moet geschieden met gesteriliseerde platinadraden. Daarbij

moeten alle mogelijke voorzorgen genomen worden tegen het binnendringen van andere kiemen, dan de gewenschte; vaste kweekbedden in buisjes houde men daarom, tijdens het afnemen van kiemen of het enten, het onderst boven; deksels van glasdoozen ligte men niet hooger op, dan noodzakelijk is; enz.

d. — De afzondering van eene aërobe bacteriënsoort uit een mengsel van bacteriënsoorten. — Vermenging van een druppel ter te onderzoeken stof met dunnen bouillon, pepton-oplossing, enz.; kweeking bij geschikte temperatuur, en herhaalde overenting van een druppel van de verkregene kweeking in eene nieuwe hoeveelheid kiemvrij kweekvocht, totdat eene reinkweeking van ééne der oorspronkelijk aanwezige geweest zijnde bacteriënsoorten verkregen is (Pasteur). — De toepassing dezer methode heeft het tweeledige voordeel, dat de samenstelling van het vocht hoogst eenvoudig kan zijn (gelatine of agar-agar niet bijgevoegd behoeven te worden), en dat althans voor sommige bacteriën het groeien bevorderd wordt. Maar daartegenover staat het nadeel, dat het volgen van dezen weg veel tijd vereischt, hoogst omslachtig is.

Het doel wordt in de meeste gevallen even goed, en dan veel sneller, bereikt door het kweken van het bacteriënmengsel op vaste kweekbedden, naar Rob. Koch's methode, zoodat elke aanwezige bacterie eene eigene kolonie vormen kan en gemakkelijk afzonderlijk overgeënt kan worden. — Geschikte middelen zijn: *plaatculturen* volgens Rob. Koch, hetzij op grootere *glasplaten*, hetzij in *buisjes* (rolculturen, volgens E. von Esmarch), hetzij in *glasdoozen*. — Zoodanige plaatculturen worden gemaakt door vermenging van een of meer druppels van het te onderzoeken vocht, of van een klein deeltje der te onderzoeken vaste stof, met vloeibaar gemaakten gelatine-bouillon, of gelatine-agar-bouillon, en het gelijkmatig uitspreiden van dat vocht over het glas; de stolling van dat kweekvocht kan bespoedigd worden door het plaatsen der platen, buisjes of doozen, op een horizontaal gelegd glazen bakje, waardoor aanhoudend koud water stroomt (Roux). De aldus behandelde platen, enz. worden daarna overgebracht in groote glasklokken of stolpen, wier bodem met doornat filtreerpapier belegd is, en die in eene broedstoof op de gewenschte temperatuur gehouden kunnen worden. De zich ontwikkelende koloniën worden in *steek-* of *streepcultuur* verder gekweekt. — Het afzonderen van eene bepaalde bacteriënsoort gelukt niet zelden nóg sneller door het maken van *streepen* over een vast kweek-

bed, met eene weinig beladene naald, en het afstrijken dezer naald snel achtereenvolgens in een zeker getal buisjes, zonder haar opnieuw te beladen, zoodat het laatstgebruikte cultuurbuisje slechts een spoor van de te onderzoekene stof ontvangt.

Eene geschikte methode tot het afzonderen van eene *pathogene* bacteriënsoort uit een mengsel van bacteriënsoorten is het overbrengen eener kleine hoeveelheid van dat mengsel in een voor de bedoelde ziektekiem bijzonder gevoelig levend dier, hetzij in de maag, hetzij onder de huid, in de buikholte, of in eene ader, enz., naar omstandigheden, (zie later).

Pfeffer 1) heeft in 1886—1888 aangetoond, dat sommige met eigene bewegingswerktuigen voorziene bacteriën door vele anorganische en organische stoffen worden geprikkeld, als zij in de nabijheid dezer stoffen komen. Ch. Ali Cohen heeft daarna ontdekt 2), in 1890, dat cholera- en typhusbacillen chemotactisch prikkelbaar zijn en vooral door kaliumzouten en asparagine, derhalve door het sap van rauwe aardappelen, sterk worden aangetrokken; beide bacillensoorten kunnen in een, met dat sap gevuld, capillair buisje worden gevangen, ook als zij zich bevinden in vochten, waarin velerlei vreemde stoffen aanwezig zijn (faeces, urine, bouillon, zeer vuil water, enz.). De inhoud van het buisje kan daarna worden gebruikt als materiaal voor microscopisch onderzoek en voor het maken van culturen.

Het kweken van bacteriën gelukt over het algemeen het best in eene *donkere* ruimte; voor eenige, kleurstof voortbrengende (chromogene), bacteriën is echter de duisternis niet bevorderlijk aan de ontwikkeling der kleurstof, zoodat de koloniën, resp. het kweekvocht of het kweekbed, de kenmerkende kleur alsdan niet, of slechts onvolkomen, verkrijgen. — De reeds ontwikkelde kleurstof kan echter ook weder verdwijnen, zelfs in eene prachtig fluoresceerende gelatine-massa, wanneer de dampkringslucht niet meer kan binnendringen door de wattenprop van het kolfje, of buisje, en de daarin reeds aanwezige zuurstof is opgeteerd. Eene kolonie kan voorts hare kenmerkende kleur ook verliezen ten gevolge van zekere, meerendeels nog niet bekende, scheikundige veranderingen der samenstelling van het kweekbed;

1) Untersuchungen aus dem botan. Institut. zu Tübingen, 1886—1888.

2) Centralblatt für Bakteriologie, 1890, n^o. 6; Ned. Tijdschr. v. Geneesk., 1893, I, p. 57.

eene cultuur van *Staphylococcus pyogenes aureus*, of van *B. prodigiosus*, bij voorbeeld, kan bij herhaalde overenting ten slotte geheel wit worden.

e. — *De afzondering van eene anaërobe bacteriënsoort uit een mengsel van bacteriënsoorten, en het overenten en voortkweken van anaërobieën*, bijv. de bacillen van het oedema malignum, het boutvuur, den tetanus, enz.

Het materiaal tot eigene oefening kan gemakkelijk op de volgende wijze verkregen worden. In een cultuurbuisje, voor $\frac{3}{4}$ gevuld met kokenden agar-agar-bouillon, werpe men 1 of 2 witte boonen; het buisje daarna te broeden bij 37° C., gedurende 24 uren; het resultaat zal eene rijkelijke cultuur van *B. butyricus* zijn. Eene reinkweeking van de bacillen der septichaemie (*vibrion septique*, *B. oedematis maligni*) kan verkregen worden door het inbrengen van een weinig tuinaarde onder de huid van den buik eener cavia cobaya, welke aarde vooraf fijn gewreven en gedurende 10 minuten tot 100° C. verhit moet zijn. Het diertje sterft dan na 36 uren en het onder de geënte plaats van den buik aanwezige vocht bevat de gewenschte reincultuur (*Salomonsen*).

Als algemeene regel geldt daarbij, vooral wanneer *obligate* anaërobieën gekweekt moeten worden, dat de gekozene kweekvochten vooraf goed gekookt moeten zijn, ter uitdrijving der lucht, en daarna snel afgekoeld in koud water. De gebruikelijkste der talrijke methoden tot het kweken van anaërobieën zijn de volgende.

a. — Het bedekken van het geënte vocht, of kweekbed, met eene stof, die de lucht afsluit. Voor een kweekvocht kan bijv. eene heldere en kiemvrij gemaakte laag olijfolie van 3 tot 5 cM. dikte dienen. — Eene met geënten gelatine- of agar-agar-bouillon bedekte glasplaat kan men bedekken met een kiemvrij en dun plaatje van glas of mica (*Rob. Koch*), maar dit verdient weinig aanbeveling, omdat de zijdelingsche toetreding van dampkringslucht daardoor niet geheel afgesneden wordt, ook al zorgt men voor afsluiting der randen van het plaatje met gesmoltene paraffine.

Het doel wordt beter bereikt door het gebruiken van een vast kweekbed, in gewone cultuurbuisjes. De entstof wordt door middel van eene lange en dunne platina-naald tot op den bodem van het halfgepulde buisje gebracht (diepe steekcultuur) en terstond daarna wordt de bovenvlakte der geënte massa bedekt met eene 3 tot 5 cM. dikke laag olijfolie, vaseline, gelatine-oplossing, een mengsel van vaseline, of paraffine, en een weinig witte was, enz. Het gebruik van

eene *stollende* bedekking is te verkiezen, omdat het buisje dan in alle richtingen bewogen kan worden zonder verontreiniging der wattenprop. Na de stolling der bedekkende massa wordt de wattenprop met gesmolten paraffine gesloten.

Nog eenvoudiger is het enten in reageerbuisjes, die *nagenoeg geheel* gevuld zijn met het gekozene kweekbed, met eene zeer lange platina-naald (Liborius). Na het afsluiten der wattenprop met paraffine zullen de aërobe bacteriën van het onderzochte mengsel in het bovenste gedeelte der massa althans eenigermate tot ontwikkeling kunnen komen, terwijl in de diepte der massa alleen de anaërobe soorten zich zullen ontwikkelen. — Roux gebruikt dunne buisjes, gelijk aan de pipette-Pasteur, die aan één der beide uiteinden dun uitgetrokken zijn; aan het andere einde is eene vernauwing gemaakt en eene wattenprop geplaatst. De dun uitgetrokken punt wordt gedompeld in het gekozene gesmolten kweekbed, en het buisje wordt tot aan de vernauwde plaats gevuld door zuiging aan het andere uiteinde. De fijne punt wordt nu toegesmolten; het geheel wordt gesteriliseerd, na uittrekking en dichtsmelting ook van het andere uiteinde. De entstof wordt door middel van een fijn glasdraadje in het buisje gebracht in het onderste puntige uiteinde, waarvan de punt vooraf even afgebroken en na de enting terstond weder dichtgesmolten wordt. Wanneer de cultuur gelukt en eene der ontwikkelde koloniën als entstof of tot microscopisch onderzoek dienen moet, behoort het buisje geopend te worden aan het uiteinde, dat aanvankelijk met eene wattenprop gesloten was geweest, omdat anders de koloniën misschien uitgedreven zouden kunnen worden door de spanning der gassen, die zich aan dat uiteinde van het buisje verzameld kunnen hebben; eerst daarna wordt de fijne punt, waardoor de enting heeft plaats gehad, afgebroken.

β . — Het vermengen van het gekozene, bij afkoeling stollende, kweekvocht met eene stof, die *gemakkelijk zuurstof opneemt*, m. a. w. *sterk reduceerend werkt*.

Liborius heeft aanbevolen cultuurbuisjes voor $\frac{2}{3}$ te vullen met een mengsel van agar-agar-bouillon en 1 % glucose. Kitasato en Weyl hebben daarna stoffen gezocht, die het tot stand komen dezer reductie verraden, met name 1 % indigosulphas natricus, of 3 tot 5 % formias natricus; zoodra de aanwezige zuurstof verdwenen is, wordt de indigo gereduceerd door de glucose en verdwijnt de blauwzwarte kleur, plaats makende voor eene donker gele. Wordt sulphas indigotini gebruikt, in plaats van indigosulphas natricus, dan wordt bij den gesmoltenen agar-agar-bouillon zooveel eener

1 %₀ oplossing van sulphas indigotini gemengd, dat de kleur traai blauw wordt; per 10 cM³ van dat vocht voegt men 3 druppels eener oplossing van 10 % KOH, en 1 % glucose. — Ook lakmoes-tinctuur is aanbevolen, 10 druppels per buisje, zoodat het mengsel violet gekleurd wordt.

γ. — De gemakkelijk zuurstof opnemende stof kan ook, *afgescheiden* van het gekozene kweekbed, met dit geënte buisje in eene grootere buis worden besloten (Hans Buchner). Het op de gewone wijze geënte buisje, gesloten met een wattenpropje, wordt op een kort en dik glasstaafje in het wijdere buisje geplaatst, waarin vooraf eenige cM³ gegoten zijn van eene oplossing van 1 gram acidum pyrogallicum in 10 cM³ eener 10% oplossing van KOH in water. Het grootere buisje daarna te sluiten met eene bevochtigde stop van caoutchouc en verticaal te plaatsen in eene broedstoof bij 30° C.; van tijd tot tijd moet het buisje voorzichtig geschud worden, ter bespoediging van de opslorping der nog aanwezige zuurstof. Men kan op deze wijze bijv. den bacil van het kwaadaardig oedeem zeer gemakkelijk kweken, ofschoon langzaam. — Een nadeel dezer methode is echter het snelle en sterke verdrogen van het vaste kweekbed.

Op gelijksoortige wijze kunnen anaërobieën in een *hangenden droppeel* gekweekt en onderzocht worden, volgens Nikiforoff. Een droppeel bouillon, op een dekglasje geplaatst, waarvan de randen met vaseline bestreken zijn, wordt geënt en op de kom van een uitgehold voorwerpglasje gelegd; de kom is voorzien van 1 droppeel eener sterke oplossing van acid. pyrogallicum en bevat op kleinen afstand ook 1 droppeel kaliloog; het incenvloeien van deze beide druppels wordt nu bevorderd door het geven van verschillende hellingen aan het voorwerpglasje, gepaard met lichte schudding of licht tikken; desnoods wordt het dekglasje even opgelicht tot het doorlaten van een fijnen glasdraad, die de beide druppels doet samenvloeien.

δ. — Het verwijderen van de nog in het geënte buisje aanwezige zuurstof door *opzettelijk mede ingeslotene aërobieën*, volgens Roux. — Het met agar-agar-bouillon voor $\frac{2}{3}$ gevulde buisje wordt gesteriliseerd in kokend water, of stoom van 100 tot 110° C., en daarna snel afgekoeld; na de inenting met behulp van een langen glasdraad wordt op de bovenvlakte van den agar-agar-bouillon eene kleine hoeveelheid gesmoltene, doch bijna weder stollende, gelatine-bouillon gegoten; zoodra deze dunne laag gestold is, brengt men daarop een paar druppels eener cultuur van *B. subtilis* en smelt men het buisje toe. Wanneer de cultuur der geënte

anaërobie slaagt en andermaal overgeënt moet worden, verbrijzele men het *onderste* gedeelte van het buisje, opdat de aanraking met den mede aanwezigen *B. subtilis* vermeden worde.

Salomonsen heeft aanbevolen, ter zekere vermindering van het laatstgenoemde gevaar, de anaërobe cultuur te enten in een dun buisje, dat nagenoeg geheel met gelatine-agar-bouillon gevuld is, dat buisje vervolgens in eene wijdere buis te plaatsen, en de tusschenruimte door middel van eene pipette aan te vullen met bouillon, waarin eene aërobe bacterie gebracht wordt; de wijdere buis worde daarna toegesmolten.

ε. — Het verwijderen van de in het geënte buisje nog aanwezige dampkringslucht door *het doorjagen van koolzuur, lichtgas, of waterstofgas*.

Het uitdrijven der lucht door een aanhoudenden stroom *koolzuur*, volgens Pasteur, wordt thans zelden toegepast, omdat dit gas de ontwikkeling van vele bacteriënsoorten vertraagt en zelfs belet.

Hetzelfde bezwaar geldt ten aanzien van het uitdrijven der lucht door *lichtgas*, volgens Würtz. Wil men deze methode toch toepassen, dan vulle men buisjes voor $\frac{1}{2}$ gedeelte met agar-agar-bouillon en 2% glucose. Na het steriliseeren vervange men de wattenprop door eene goed sluitende dubbel doorboorde prop van caoutchouc; in het eene kanaal het dunnere ondereinde van een niet al te dun uitgetrokken glazen buisje, tot even beneden de prop; in het andere kanaal een langer buisje, waarvan het boven einde horizontaal omgebogen is en het ondereinde tot dicht boven de oppervlakte van het kweekbed reikt. Dat kweekbed wordt daarna gekookt en terstond late men dan gas instroomen door de langste der beide buizen; het uit de kortere buis uitstroomende gas worde aangestoken, en deze vlam blijve 5 minuten branden. Vervolgens wordt de gaskraan gesloten en gelijktijdig door de kortere buis kiemvrije olijfolie ingegoten, zoodat eene laag van 2 c.M. dikte op den kweekbodem drijft. Na bekoeling wordt de olie door schuinsche richting van het buisje van een klein deel der oppervlakte van het thans gestolde kweekbed verwijderd, en wordt op die plek eene met kweekstof beladene platinanaald ingestoken, die aan den *wand* van een dun buisje is vastgesmolten; door dat buisje stroomt lichtgas, zoolang de enting duurt. Ten slotte wordt het cultuurbuisje gesloten met eene bevochtigde caoutchouc-stop, of in de vlam.

Waterstofgas kan gemakkelijk ontwikkeld worden in een

door Jorgensen bedachten eenvoudigen toestel. Een gewoon cilinderglas voor eene petroleum- of olielamp wordt in een wijd moiglas opgehangen door middel van eene doorboorde kurk, die in den bovenrand van het molglas nauwkeurig past; het molglas is tot $\frac{1}{8}$ der hoogte gevuld met verdund zwavelzuur (1 : 8 water), waarbij 2 druppels eener oplossing van platina-chloruur gevoegd zijn. Boven de vernauwing van het lampenglas is een doorboord en in mousseline gewikkeld looden plaatje gelegd; daarop worden eenige stukjes zuiver zink geplaatst. Het bovineinde van het lampenglas wordt nauwkeurig gesloten door eene stop van caoutchouc, waardoor een aan beide einden rechthoekig gebogen glazen buisje gestoken is en het ontwikkelde waterstofgas ontsnappen kan. Dit gas wordt van zuurstof bevrijd in een waschfleschje gevuld met een mengsel van 1 deel eener 25% oplossing van acidum pyrogallicum in water, en 10 deelen eener 60% oplossing van KOH in water. — Is het gebruikte zink niet volkomen zuiver, dan moet het gas eerst gewasschen worden in eene alcalische loodoplossing tot het verwijderen van misschien gevormde zwavelwaterstof; vervolgens in eene oplossing van salpeterzuur zilver tot het verwijderen van arsenicum; en daarna in de bovenvermelde oplossing van acidum pyrogallicum, — Het aldus verkregene zuivere waterstofgas kan tot het uitdrijven der lucht gebruikt worden op de wijze, die boven voor het lichtgas beschreven is, doch moet *door het gesmoltene voedingsvocht heenborrelen*, volgens Fränkel gedurende 4 minuten, opdat de aanwezige vrije zuurstof volledig uitgedreven worde; Hüppe laat het gas 10 minuten achtereen doorstroomen.

Het enten van het gesmoltene kweekbed kan vóór het doorvoeren van waterstofgas geschieden, wanneer men geen nadeel vreest van den warmtegraad, die tot het verhoeden der stolling gedurende het doorvoeren van het gas noodzakelijk is. Anders is m. i. de volgende handelwijze aan te bevelen, die tevens den last van het uitsteken van glazen buisjes boven de caoutchouc-stop vermijdt. In plaats van die glazen buisjes worden dunne metalen buisjes gebruikt; na het doorjagen van waterstofgas door het gesmoltene, doch ongeënte, kweekbed trekke men het aanvoer-buisje op tot vlak boven de oppervlakte van het vocht en koele men het cultuurvocht af, totdat het stolt, terwijl waterstofgas steeds blijft doorstroomen. Het cultuurbuisje daarna het onderste boven keeren en enten, vervolgens weder over-eind zetten, steeds onder doorstroming van waterstofgas; na 10 minuten de beide gasleidingsbuisjes optrekken, totdat

hunne onderste uiteinden in hetzelfde vlak liggen als de onderste vlakke der caoutchouc-stop; de beide buisjes eindelijk met eene platte tang dichtknijpen vlak boven de stop, afknippen, en het bovenende van het cultuurbuisje dompelen in gesmolten kit (was en hars).

Wil men *rolbuisjes* maken, naar E. von Esmarch's methode, dan kan dit gemakkelijk geschieden, naar Frankel, die 3 verdunningen maakt en vóór het doorleiden van waterstofgas ent, of naar de zoo even beschrevene methode, die het uitsteken van de zoo breekbare stompjes van glazen buisjes vermijdt.

Een zeer geschikt middel tot het opsporen van anaërobe bacteriën in eenig vocht, alsmede tot het kweken van zoodanige bacteriën in reincultuur op gelatine-, of gelatine-agar-agar-bouillon platen, of op aardappelschijfjes, is bedacht door Hans Blücher te Giessen. Een glasdoosje van 7 cM. middellijn wordt ongedekt geplaatst in een wijder en hooger glasdoosje, en daarin tegen verschuiving behoed door een ring van koperdraad met 3 of 4 pootjes; op die uitgebogen pootjes rust een glasklokje, waarvan de naar boven gekeerde top tot een nauw buisje is uitgetrokken; over dat buisje is een zware looden ring gelegd, ter aandrukking van den onderrand van het klokje tegen de pootjes; in het buisje is eene wattenprop geplaatst. Deze toestel wordt gesteriliseerd in heete lucht van 160° C. Na bekoeling van dezen toestel wordt het gesmolten en geënte kweekvocht snel in het kleinste glasdoosje geschonken, resp. de geënte aardappelschijf in dat doosje gelegd, en met het glasklokje bedekt; vervolgens wordt in het wijdere doosje eene oplossing van glycerine van 1:3 of 4 deelen water geschonken, totdat de onderrand van het glasklokje goed ondergedompeld zij. Door het buisvormige einde van het glasklokje wordt dan waterstofgas, of eenig ander gas, ingestuwd, waardoor de lucht langs den onderrand van het glasklokje wordt uitgedreven; zoodra de uit de glycerine-oplossing opborrelende gasbellen zonder geruisch rustig verbranden, als een brandende waslucifer *dicht* daarbij gehouden wordt, is de lucht uitgedreven. Na ontwikkeling van eene anaërobe bacterie in de broedstoof kan het kleine glasdoosje uit den toestel genomen en met zwakke vergrooing onderzocht worden; des gewenscht, kan het anaërobe kweken daarna nog weder worden voortgezet. — Botkine heeft eenige wijziging van dezen toestel aanbevolen. De klok is nl. hooger en van boven gesloten, en rust op een glazen kruis in een wijder glasschaaltje; tegenover elkander zijn 2 dunne Svormig gebogene glazen buisjes met eene der bochten

onder den rand van het glazen klokje binnen deze klok geschoven, bestemd tot het doorleiden van waterstofgas; de afsluiting der lucht wordt verkregen door glycerine-oplossing, of door gesmolten paraffine; het doorvoeren van waterstofgas moet $\frac{1}{2}$ uur duren.

Wanneer groote hoeveelheden, bijv. 0,5 Liter, bouillon of ander kweekvocht van vrije zuurstof beroofd en onder waterstofgas gehouden moeten worden, is het gebruik van den volgende toestel aan te bevelen. Eene flesch van 1 L. inhoud wordt van eene dubbel doorboorde prop van caoutchouc voorzien; in het eene kanaal schuift men eene scherphoekig gebogene dunne glazen buis, die tot op den bodem der flesch reikt en wier andere arm tot eene punt is uitgetrokken en toegesmolten; in het andere kanaal eene veel kortere scherphoekig gebogene buis, die tot even beneden de stop reikt, doch wier afgebogene arm van twee bolvormige verwijdingen is voorzien tot het opnemen van wattenpropjes. Deze toestel, gevuld met het gewenschte vocht, wordt 15 minuten lang gekookt bij 115° C. Na bekoeling wordt de buitenarm van het eerstgenoemde buisje met eene spiritusvlam verhit („geflambeerd“) en in de stamcultuur of het te onderzoeken vocht gedompeld; de punt wordt met een kiemvrij pincet afgebroken en door zuiging aan het bollenbuisje wordt eene hoeveelheid vocht in de kolf overgebracht. Vervolgens wordt in dezelfde richting waterstofgas doorgeleid; na 10 minuten de punt dichtgesmolten van den eenen arm, en terstond daarna het gedeelte tusschen de beide bolletjes van de andere buis.

§. — Het verwijderen van de in het geënte en geslotene buisje, kolfje, enz., nog aanwezige dampkringslucht door *uitpomp*ing, bijv. met de luchtpomp van Sprengel-Hüfner, of met eene waterstraalluchtpomp. — Dit kan zeer doelmatig geschieden bij het gebruik van de met een langen steel voorziene, door Roux bedachte buisjes; in den steel is een gedeelte dun uitgetrokken; op die plek wordt het buisje dichtgesmolten, nadat de uitpomping het gewenschte gevolg heeft gehad. — Lastiger in het gebruik zijn de U vormige buisjes van Pasteur, omdat zij zoo breekbaar zijn. Eene glazen buis wordt nl. U vormig gebogen en aan beide uiteinden gesloten. Aan de bovenzijde der bocht van het onderstboven gehouden buisje wordt eene kleine opening gemaakt, en daaraan wordt een dun buisje vastgesmolten, dat loodrecht op het midden der bocht van de omgekeerde U staat; het is dicht bij de bocht een weinig uitgetrokken, opdat het op dat punt dichtgesmolten zou kunnen worden, en het uiteinde is door eene

wattenprop gesloten. Ter weerszijden van dat buisje wordt in de bocht nog een gaatje gemaakt en een buisje aangesmolten, dat evenwijdig aan het resp. been der Π omgebogen, puntvormig uitgetrokken en toegesmolten is. — Een gelijksoortigen toestel heeft Pasteur laten vervaardigen uit een buisje, gelijk aan het zooeven beschrevene van Roux, doch voorzien van een aangesmolten buisje als bij den U vormigen toestel. — Ook de pipette van Pasteur (zie boven, p. 18) kan tot hetzelfde doel gebruikt worden.

Tot het kweken van anaërobieën op een stukje aardappel gebruikt Roux een glazen buisje met geringe vernauwing even boven den bodem (zie boven, p. 14), en met een in den zijwand van dat onderste half afgesnoerde gedeelte ingesmolten, loodrecht op dat gedeelte gericht dun glazen buisje met vernauwing en watteprop. Na het enten van het aardappelschijfje smelt men de opening van het cultuurbuisje toe en verbindt men het zijwaarts aangebrachte buisje met de luchtpomp; ten slotte wordt ook het laatstbedoelde buisje dichtgesmolten.

Eene waterstraal-luchtpomp geeft slechts eene onvoldoende luchtverduunning, wanneer het water in de leiding niet onder hooge drukking staat: men zou de uitpomping dan met het doorjagen van waterstofgas kunnen verbinden (Roux). Op een cultuurbuisje met lang uitgetrokken steel, volgens Roux (zie boven, p. 23), wordt een $\perp$ vormig glazen buisje bevestigd, dat in elken arm eene kraan heeft; het boven einde van dat buisje is verbonden aan de luchtpomp en het horizontale been aan den toestel tot het ontwikkelen van waterstofgas. Men begint dan met de uitpomping en sluit de kraan, als het vocht al te sterk begint te borrelen; daarna wordt de kraan voor het waterstofgas geopend; vervolgens weder gesloten en de kraan voor de luchtpomp geopend, en deze afwisseling wordt 3 tot 4 maal herhaald.

7. — Het kweken van anaërobe bacteriën in *kippeneieren*, volgens Hüppe en Heim. — Een versch kippenei worde sterk geschud, afgewasschen in soda-oplossing, daarna in water, vervolgens in sublimaat, dan in zwavelammonium-oplossing, in alcohol en eindelijk in aether. De punt van het ei, waarin nog lucht bevat is, worde nu geflambeerd, waardoor eene zwarte kleur ontstaat. Op die plek worde met eene gegloeide naald een gaatje geprikt en de entstof met een glazen capillairbuisje of platinadraad diep ingevoerd.

Verduurzaamde culturen kunnen naar Soyka en Franz Král zeer gemakkelijk gemaakt worden; de afsluiting van

de dampkringslucht geschiedt, volgens Czaplewski, in buisjes, door het drenken van de wattenprop met gesmolten paraffine, in glasdoozen door het bestrijken van den dekselrand met die stof. Zeer vele aërobe bacteriënsoorten blijven op die wijze gedurende 1 jaar, en nog langer, geschikt om te worden overgeënt; onder de ziektekiemen zijn er daarentegen eenige, wier overentbaarheid veel vroeger verloren gaat, bijv. *Streptococcus erysipelatis*. Bij nauwkeurige kennis van deze tijdverschillen kan men zich zonder buitengewone inspanning een vrij volledig bacteriologisch museum verschaffen, waarin elke soort gekweekt is op daarvoor geschikte substraten: de niet-vervloeiende namelijk op gelatine, agar-agar, glycerine-agar, glyc. gluc. agar, aardappel, de schimmelsoorten ook op koolraap, zoodat de gelegenheid tot vergelijking bij het determineren van een gevonden micro-organisme steeds gegeven is.

III. Het nemen van bacteriologische proeven op levende dieren. — De *ziekmakende* werking van een micro-organisme op een levend dier is bewezen, wanneer: 1° dezelfde kiem *altijd* gevonden wordt bij de resp. ziekte, en bij geene andere; en 2° na het inenten of ingeven van eene reinkweeking eener kiem dezelfde ziekte ontstaat, en daarna deze kiem in de vochten, weefsels of organen van het dier kan worden teruggevonden.

De gebruikelijkste proefdieren zijn: gewone muizen, witte muizen, ratten, *cavia cobaya's*, duiven, kippen, konijnen en honden.

Het *bedwelmen* van het dier, in geval van pijnlijke proefneming, kan bij muizen en ratten gemakkelijk geschieden met aether onder eene glazen klok, en na het binden zonder nadeel worden onderhouden. *Cavia's* en konijnen moeten *zeer voorzichtig* met chloroformdamp bedwelmd worden op de gewone wijze. Bij gewone inenting is het bedwelmen onnoodig.

Muizen en ratten worden met eene lange gevensterde tang bij het oor gepakt en over de tang gelegd zoodanig, dat de achterpooten op de tang rijden en de staart vastgehouden worde in de hand, die de tang voert. — *Cavia's* en konijnen worden vastgebonden op een plankje, dat aan elken hoek van eene waterpas ingedrevene ijzeren pen voorzien is; de pooten van de dieren worden diagonaalsgewijze aan die pennen vastgebonden: eerst een achterpoot, daarna een voorpoot aan de tegenovergestelde zijde, enz. — Een hond moet men eerst den bek toebinden met een touw, waarvan het midden achter de snijtanden der onderkaak gelegd wordt; de einden worden

onder de onderkaak samengeknoot, daarna naar den neuswortel gevoerd en aldaar mede samengeknoot, dan nog eens toegeknoot onder de onderkaak en eindelijk samengeknoot in den nek. De hond wordt op eene met lood bekleede tafel gelegd van $1 \times 0,60$ M. oppervlakte; eerst wordt een voorpoot aan de in het tafelblad bevestigde pen vastgebonden, daarna de achterpoot der tegenovergestelde zijde, enz.

Het inenten kan op velerlei wijzen geschieden, namelijk door: openkrabben der opperhuid met een besmet mesje, — inspuiting onder de huid, in eene ader (bijv. oor of poot van een konijn), in de buikholte, in de voorste oogkamer, of onder het harde hersenvlies. Voorts ook door inademing, en door invoering in de maag.

De ingevoerde ziektekiem kan opgezocht worden in: het bloed, de urine, de melk, de in lichaamsholten uitgestorte vochten, de milt en andere organen, en in de spieren. Daarbij is met de grootste zorg te waken voor *aseptisch* werken, opdat geene kiemen van buiten worden binnengebracht; kiemvrij maken van de in te snijden plek der huid, de oppervlakte van een orgaan, de handen en instrumenten, enz., en het opvangen van het afgenomene op of in kiemvrije voorwerpen, tot verder onderzoek.

IV. — **Onderzoek van drinkwater.** — Kiemvrije stopfleschjes van 100 cm^3 op de plaats zelve vullen met het water, nadat elk fleschje tienmaal met hetzelfde water uitgespoeld is; aan eene pomp mag dit eerst geschieden, nadat 10 minuten achtereen water opgepompt en weggevoerd is. De gevulde fleschjes terstond overbrengen in een aangrenzend stofvrij lokaal, alwaar gereed staan: eene spirituslamp, gesteriliseerde en geijkte pipetten van 1 cm^3 , kiemvrije buisjes met gelatinebouillon en kiemvrije dubbele glasschaaltjes met overhangend deksel. De gelatinebouillon smelten in lauw water; met eene pipette eenige dezer buisjes bedeele resp. met 1, 2, 4, 6, 10 en 15 droppels, schudden zonder schuim te maken, $\frac{1}{4}$ van den inhoud van elk dezer buisjes uitgieten in een schaal, welks deksel even en zoo min mogelijk wordt opgelicht; in dat schaalje het ingegotene vocht gelijkmatig verdeelen en laten stollen; het in het buisje overgeblevene $\frac{1}{4}$ gedeelte van het vocht gelijkmatig verdeelen over den binnenwand van het buisje (rolbuisjes). Des zomers de stolling bevorderen door het gebruik van ijs; des winters het lokaal niet boven 12° C. verwarmen. De geladene buisjes en glasschaaltjes daarna plaatsen in een gesloten metalen bus met vilten buitenbekleding en met dubbelen bodem,

waarin des zomers stukjes ijs gelegd zijn; de bus snel overbrengen naar het Laboratorium tot nader onderzoek; de zich ontwikkelende koloniën aldaar tellen en het getal per 1 cM³ water berekenen; de koloniën determineeren.

‘Bij het zoeken naar *typhusbacillen* de koloniën, die een begin van vervloeiing vertoonen, alsmede schimmels, dadelijk uitlichten met een kiemvrij lepeltje, en een grooter aantal plaatculturen maken resp. met 1, 2 en 3 droppels van het verdachte water. In dat geval aan de bron ook buisjes, waarin gewonen voedingsbouillon, met 1 cM³ van het verdachte water bedeele; broeden bij 42° C. (Vincent). — Of wel, gelatine-bouillon *zuur* maken door toevoeging van het sap van rauwe aardappelen: typhus-bacillen groeien daarop zeer goed, vele der storende (als typhusbacillen groeiende) bacteriën daarentegen niet. H. Jaeger heeft deze goede, door Max Holz 1) bedachte methode eenigermate gewijzigd ter vergemakkelijking der bereiding; het uitgeperste aardappelsap wordt nl. niet gedurende 24 uren met rust gelaten en daarna gefiltreerd, maar (op raad van Dr. Wacker, te Ulm) terstond bij den gelatine-bouillon gemengd en met dezen gekookt: de slijmige bestanddeelen van het sap worden daardoor beter en veel sneller uitgescheiden, dan door het eerstbedoelde bezinken en filtreren. Jaeger 2) heeft ook de door Holz aanbevolene bijmenging van carbolzuur bij den zuren gelatine-bouillon nagelaten, opdat de misschien reeds zeer verzwakte typhusbacillen door het carbolzuur niet nog meer verzwakt zouden worden. Elk cultuurbuisje ontvangt 0,1 tot 0,5 cM³ van het verdachte water. Het getal der kiemen ontwikkeld op de platen met aardappel-gelatine, bedraagt slechts $\frac{1}{4}$, en zelfs $\frac{1}{20}$ van dat der kiemen op de platen met gewonen *neutralen* gelatine-bouillon (Jaeger). — Of wel, de geënte buisjes $\frac{1}{2}$ tot 1 uur in een waterbad tot 45° C. verhitten; de storende bacteriën, die de gelatine doen vervloeien, worden daardoor onschadelijk gemaakt (Rodet). — Men kan ook eenige buisjes bedeele met 10 cM³ neutralen voedingsbouillon en 3 tot 9 droppels eener oplossing van 4 gram zoutzuur en 5 gram carbolzuur in 100 cM³ water, en deze buisjes 24 uren bij 37° C. broeden; daarna eenige droppels van het verdachte water bijmengen; bij aanwezigheid van typhusbacillen in dat water wordt de gelatine na 24 uren broedens troebel. — Bij het toepassen van alle deze

1) Zeitschrift für Hygiene, VIII, 1890, p. 143.

2) Ibidem, X, 1891, p. 212.

onderzoekings-methoden behoort altijd eene vergelijking met stellig echte typhus-bacillen plaats te hebben. Er blijft n.l. nog een onderscheidingskenmerk ontbreken, dat *uitsluitend* aan den echten typhusbacil toekomt; voorloopig moeten daarom *alle overige kenmerken te zamen* zorgvuldig vastgesteld worden.

Bij het zoeken naar *cholera*-bacillen eenige buisjes bijna ten halve vullen met vrij sterk alcalischen voedingsbouillon en daarbij resp. 1, 5, of 10 cM³ van het verdachte water voegen; broeden bij 37° C.: na 24 uren overenten in gelijksoortigen bouillon, uit de oppervlakte van het gebroede vocht, resp. uit een aan de oppervlakte gevormd vliesje, en andermaal 24 uren broeden; vervolgens overenten in gelatine, steeken plaatculturen maken, en in den overblijvenden bouillon de cholera-rood-reactie beproeven. — Het is echter wenschelijk gelijktijdig ook grootere hoeveelheden van het verdachte water te onderzoeken, namelijk 200 cM³ water te vermengen met 10 cM³ alcalischen pepton-bouillon en dat mengsel 24 uren te broeden bij 37° C. Daarna platen gieten, enz., als voren (Löffler) en de verdachte koloniën vergelijken met die van echte cholera-bacillen.

V. Onderzoek van aarde. — Het *volumen* der onderzochte hoeveelheid aarde bepalen; niet het *gewicht*. Deze aarde *op de plaats zelve* (dit vooral, indien de aarde uit eenige diepte opgehaald wordt) vermengen met gesmoltenen gelatine-bouillon en vrij sterk schudden, opdat de aanklevende kiemen los geraken. Of wel, de aarde eerst schudden in voedingsbouillon, en daarna dezen bouillon met gelijke deelen, of grootere hoeveelheid (sterkere verdunning), gelatine-bouillon vermengen. Vervolgens nader onderzoeken, als sub IV. (zie boven, p. 26) voor het drinkwater aanbevolen is: het maken van rolculturen is niet raadzaam, omdat aarde gewoonlijk vele vervloeiende bacteriën bevat.

VI. Onderzoek van dampkringslucht. — Twee methoden: eene gemetene hoeveelheid lucht in kleine bellen laten strijken door een geschikt voedingsvocht, of wel hare stofdeeltjes laten afzetten, of neerslaan, op een vloeibaren of vasten kweekbodem. Het meten kan geschieden door middel van een gewonen glazen aspirator, die geheel met water gevuld is, en dat water in een bepaalden tijd laat uitvloeien door eene even boven den bodem der flesch geplaatste kraan, of wel door middel van een gasmeter, die aan eene waterstraallucht-pomp verbonden is.

1^e *methode*. — Aëroscoop volgens Miquel, volgens R. Emmerich, of volgens Strauss en Würtz.

Strauss en Würtz bedeeñen den gesmoltenen gelatine-bouillon, waardoor de lucht moet heenborrelen, met een druppel kiemvrije olijfolie, opdat bij betrekkelijk snelle doorstrooming van lucht (50 L. in 10 minuten tijds) geen schuim gevormd worde.

2^e *methode*. — Aëroscoop volgens Pouchet of volgens Schoenauer. De laatstgenoemde is doelmatiger dan de eerstgenoemde aëroscoop, omdat de lucht door een aspirator gedwongen wordt, door eene glazen buis te strijken, wier onderste punt slechts één mM. boven een glasplaatje staat, dat onder de glazen klok (met dubbel doorboorde stop) op een bekerglaasje gelegd is. Bij den aëroscoop van het observatorium te Montsouris staat het plaatje, waarop de luchtstoot gericht wordt, verticaal. — De plaatjes in deze toestellen worden bestreken, volgens Miquel's aanbeveling, met 2 deelen glycerine en 1 deel glucose. Het daarop neergestrekene en vastgehoudene stof moet onder den microscoop en door kweeking onderzocht worden.

Aëroscoopen, die de kiemen der lucht terughouden in de poriën van hun vulsel, zijn die van Petri, van Frankland, en van Miquel. — Bij den aëroscoop van Petri bestaat het vulsel uit kiemvrij zand; bij dien van Frankland uit 2 propjes kiemvrije glaswol; bij dien van Miquel uit riet-suiker of anhydre zwavelzure soda. De laatstgenoemde aëroscoop verdient de voorkeur boven de beide andere, omdat het vulsel *oplosbaar* is, de opgenomene kiemen derhalve *alle* in den gesmoltenen gelatine-bouillon verdeeld worden.
