

NOWA METODA

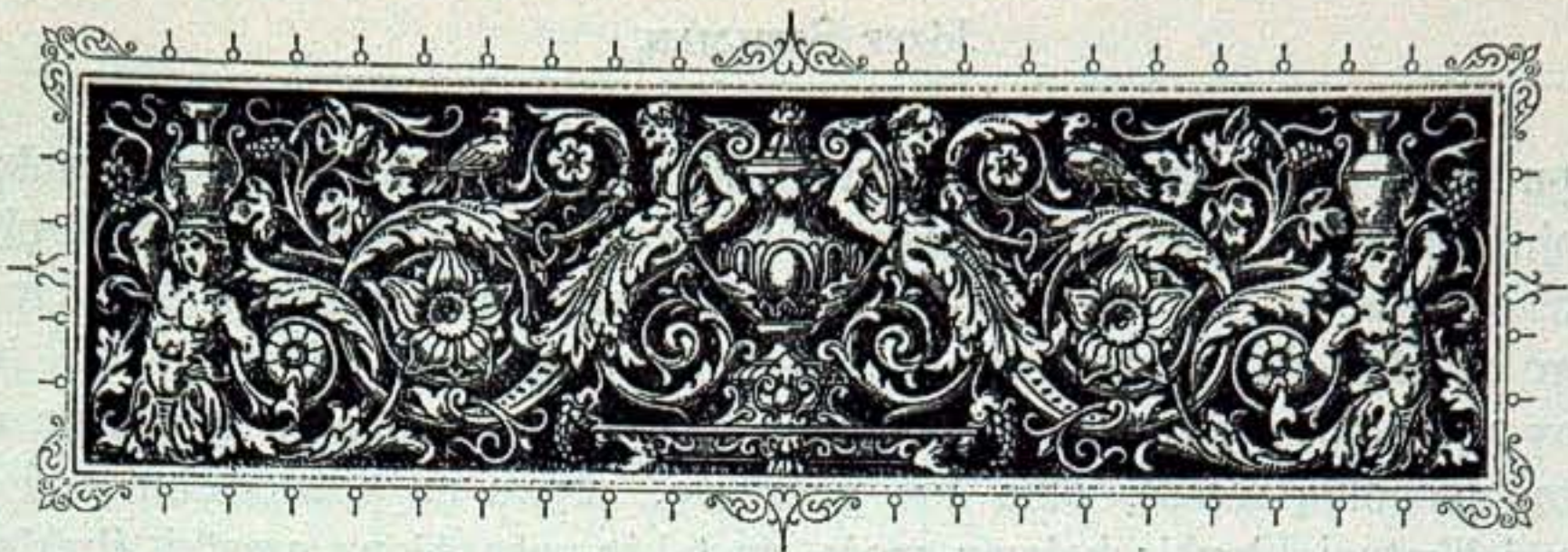
FOTOGRAFOWANIA HODOWLI BAKTERYJ

W ZWYKŁYCH I WŁASNEGO POMYSŁU PROBÓWKACH

PODAŁ

JÓZEF SZPILMAN.





Wygład kultur różnych bakterij hodowanych na jednym i tem samem podłożu jest dla wielu gatunków tak cechujący i typowy, że jedynie na tej podstawie można jeden gatunek od drugiego odróżnić; z drugiej strony hodowle tego samego gatunku bakterij na różnych glebach odżywczych cechują się często pewnymi charakterystycznymi własnościami, które dla szczegółowej systematyki bakterij mają doniosłe znaczenie. Najwięcej używaną w bakterjologii pożywką jest zaprowadzona przez R. Kocha żelatyna, mająca tę zaletę, że mimo różnych dodatkowych składników, które dowolnie możemy zmieniać, pozostaje stale przezroczystą. Pożywka ta z powodu zawartości kleju jest zarazem odczynnikiem dla zaczynów bakterij powodujących peptonizację (rozpływających żelatynę) i po dodaniu n. p. cukru gronowego, lakmusu, indyhtu można łatwo zapomocą niej wykazać zdolność pewnego gatunku bakterij do wywołania swoistych procesów fermentacji, odtleniania itd. Żelatyny używa się do sporządzania hodowli płytkowych i kreskowych. Na kulturze płytkowej z jednego zarodnika bakterij wytwarza się kolonia, której rozwój dla wielu gatunków typowy możemy gołym okiem śledzić jak i przy słabem powiększeniu badać, uwzględniając wielkość kolonii, jej kształt, brzegi (kontury), barwę w świetle wpadającym i przepuszczającym, połysk, jakość powierzchni (gładkość, ziarnistość itd.), tworzenie się wypustek promienisto, falisto w otoczenie wnikających, rozpływanie żelatyny w obwodzie kolonii i wnikanie barwnika w otoczenie itd. Szczegóły te budowy zewnętrznej jak i struktury wewnętrznej (słab. pow.) najlepiej badać na koloniach powierzchniowo położonych, które z powodu

dostępu tlenu i małego oporu znajdują się w przyjaźniejszych warunkach rozwoju od kolonii w głębi żelatyny położonych, z wyjątkiem anaërobów i mikraerobów, które przy braku lub niedostatecznym przystępie tlenu rosną dopiero w głębi żelatyny, tworząc charakterystyczne mgiełki względnie inne zmiany w podłożu. W razie rozplynniania żelatyny kolonia albo opada na dno tworząc jednolitą całość, albo też unosi się, pływa na powierzchni pod postacią delikatnej błonki; kolonia może się także rozpaść na cząstki (bakterye ruchome), skutkiem czego powstaje zmętnienie cieczy jednostajne lub niejednostajne. Przy szybkim odparowaniu cieczy kolonia się zagłębia, tj. leży głębiej od otaczającej ją powierzchni żelatyny; przeciwnie przy powolnem rozplynnianiu i wysychaniu kolonia przedstawia zagłębienie wyścielone nalotem bakteryj.

Podobne różnice rozwoju poszczególnych gatunków bakteryj można zauważyć w kulturach kłutych, żelatynowych; szczególnie można tu studyować zależność wzrostu, produkcji barwika, rozplynniania od przystępu lub braku tlenu. Anaëroby (beztlenowe bakterye) rosną tylko w głębi żelatyny nieraz dopiero na kilka centymetrów pod powierzchnią; względne aëroby rozwijają się jednostajnie wzdłuż ukłucia, bezwzględne zaś aëroby w górnej części linii ukłucia. Przy badaniu wyglądu kultur kłutych rozróżniać trzeba bakterye rozplynnające i nierozplynnające żelatynę. Przy nierozplynnających uwzględniamy rozwój wzdłuż ukłucia i na powierzchni. Jeden rodzaj rozwija się na powierzchni jednostajnie, tworząc cienką błonkę, inny zaś zajmując małą tylko część powierzchni tworzy płaską lub półkulistą wypukłość (jakoby główkę gwoździa); co się zaś tyczy rozwoju wzdłuż linii ukłucia, to jedne bakterye rosną tylko w górnej części, inne zaś bujnie wzdłuż całego ukłucia tworząc rodzaj jednostajnej smugi (wstęgi), to znowu szereg kuleczek spływających ze sobą albo też odosobnionych ziarenek. Niektóre wyrastają poza linię ukłucia tworząc chmurowate zaćmienia, albo drzewkowato się rozgałęziające nitki, wypustki. Co do gatunków rozplynnających, to jedne rozplynnają żelatynę bardzo powoli, inne szybko a nawet bardzo szybko, co zależy od szybkości peptonizacji i zdolności rozwoju bakteryj w głębi żelatyny. Pewne gatunki rozplynnają żelatynę na powierzchni i w głębi jednostajnie i to tak przy przystępie tlenu jak i braku tegoż (woreczkowate, pończoszkowate rozplynnianie). U większej ilości gatunków tworzenie się zaczynu peptonizującego zależy od przystępu tlenu i wtedy żelatyna rozplynnia się od góry miseczkowato, lejkwato ku dołowi, przyczem zdarza się często, zwłaszcza gdy rozwój wszerek postępuje, że górna część żelatyny zupełnie się rozplynnia, w dolnej zaś zaznacza się tylko skąpy rozrost wzdłuż ukłucia i to bez rozplynniania albo z bardzo nieznacznym rozplynnianiem żelatyny. Przy bardzo nieznacznym rozroście wszerek i równoczesnym nader powolnem rozplynnianiu podłoża, tworzy się w górnej części kultury kłutej bańka powietrza, pod nią zaś znajduje się tylko wązki lejek rozplynnionej pożywki, a jeżeli rozplynnianie idzie w parze z wysychaniem

tj. odparowaniem cieczy, wytworzonej skutkiem rozpląnięcia się żelatyny, to powstaje lejek powietrzny w całości nalotem bakteryj powleczonej. Jeżeli bakterie w rozpląnionej żelatynie jednostajnie się rozdziela, to ciecz wytworzona będzie także jednostajnie mętną, albo też cała masa bakteryj opada ku dołowi a płyn się wyjaśnia, albo też pozostaje na powierzchni tworząc jużto lekką, pulchną, jużto zbitą powłoczkę. Nie brak także przejść od jednego typu rozwoju ku innym. U niektórych anaërobów można zauważyć rozpląnianie się żelatyny w ogniskach rozrzuconych, tj. tworzą się kulki rozpląnionej żelatyny, od których powierzchni wychodzą wypustki w otoczenie, ulegające znowu dalszemu rozpląnianiu.

Wiele także gatunków bakteryj ma własność wytwarzania gazów; szczególnie widzieć można w hodowlach kłutych, że powstają pęknięcia, szczeliny tj. bańki gazowe i to nietylko wzdłuż ukłucia ale i na innych miejscach w głębi pożywki, co przemawia za zdolnością fermentacyjną danego gatunku bakteryj. Kultury kłute nadają się więc szczególnie do badania w tym kierunku. Jeżeli bańki gazowe wytwarzają się bez dodania np. cukru gronowego, to tylko dowodzi, że pożywka (sok mięsny) zawierała już składniki do fermentacji sposobne. Także w hodowlach kłutych można bardzo dobrze badać odtlenianie (własności redukcyjne pewnych gatunków bakteryj), jak i wytwarzanie się barwika, który jużto trzyma się wyłącznie pokładu bakteryj, jużto wnika w pożywkę. Pożywki żelatynowej używa się także do sporządzania kultur kreskowych.

Po żelatynie drugą bardzo ważną głębę odżywczą stanowi agar, łączący z przezroczystością odporność przeciw wyższym temperaturom, tj. przy ciepłocie 37° C, przy której zazwyczaj hoduje się bakterie. Pożywka ta, której żaden gatunek bakteryj nie rozpląnia, pozostaje w tej ciepłocie stałą. Szczególniej zaleca się ta pożywka do studyów rozwoju bakteryj żelatynę rozpląniających. Na hodowlach płytowych agarowych nie występują tak charakterystycznie różnice w rozwoju kolonii bakteryj, jak na płytkach żelatynowych, a to z powodu wielkiej odporności agaru. I tu kolonie powierzchniowe rosną bardziej typowo aniżeli głęboko położone. Na kulturach kreskowych agarowych w probówkach lub na płytkach występują przy hodowli wielu bakteryj cechy dość charakterystyczne, wystarczające do odróżnienia poszczególnych gatunków; wielkość kolonii, przezroczystość lub nieprzezroczystość, suchość, wilgotność, gładkość, nierówność powierzchni, wzrost szybki lub powolny itd., to własności, które dają nam punkt oparcia przy okraśleniu i rozpoznawaniu gatunków. I na kulturach kłutych agarowych można także badać pewne własności bakteryj, jak potrzebę tlenu, zdolność redukcji i fermentacji.

W pewnych celach używa się stężonej surowicy krwi jako pożywki stałej i przezroczystej. Surowicy używa się tak przy ciepłocie pokojowej jak i wyższej (37° C) do hodowli płytowych i kreskowych, na których uwidocznia

się większa różnorodność co do form rozwoju bakterij jak na agarze, a to z powodu zdolności rozpląniania surowicy przez pewne bakterie; np. bakterie cholery azjatyckiej rozpląniają surowicę silniej niż żelatynę, inne zaś słabiej.

Jedną z najdawniejszych, bardzo rozpowszechnionych pożywek są gotowane ziemniaki, nadające się do kultur płytowych i kreskowych, na których wygląd kolonii wielu bakterij rozmaicie się przedstawia co do kształtu, barwy, jakości powierzchni, konsystencji itd., dlatego też bakterjologowie chętnie się posługują tą pożywką, na której pewne gatunki bakterij bardzo charakterystycznie rosną.

Z płynnych pożywek najczęściej używany jest bulion mięsno-peptonowy, w którym bakterie rosnąc tylko na powierzchni tworzą mniej lub więcej zbite błonki, to znowu powodują jednostajne albo też niejednostajne zmętnienie; w ostatnim wypadku kępki bakterij przyczepiają się do ścian, opadają na dno, tworząc często osad ciągliwy lub wiotki, po nad którym bulion sam się wyjaśnia. Bulion nadaje się także do studjum anaërobiozy bakterij.

Bakterjologowie używają w pewnych celach jeszcze innych pożywek, zazwyczaj jednak ograniczają się do powyżej wymienionych, mieszając je niekiedy z pewnymi dodatkami jak np. z gliceryną, cukrem gronowym itd. Każda jednak zmiana w składzie i przyrządzeniu pożywki, jak i zmiana warunków, wśród których dany gatunek bakterij się hoduje, jak ciepłota, jakość materiału użytego do zasiewu (ze starej czy świeżej hodowli) itd. odbija się niewątpliwie w wyglądzie kultury i zmodyfikuje cechy dla niej charakterystyczne. Dlatego też byłoby pożądanem, ażeby wszyscy bakterjologowie przyrządzali pożywki według tych samych przepisów i wśród jednakowych warunków bakterie hodowali, co by wielce ułatwiło wzajemne porozumienie się co do własności opisywanych gatunków.

Z powyższego przedstawienia wstępnego przekonać się można, że pewne gatunki bakterij hodowane na tej lub owej pożywce rosną charakterystycznie i dlatego też bakterjologowie przy opisie odkrytych przez nich gatunków starają się te cechy uwydatnić i o ile możności rysunkiem wiernie przedstawić, jak dany gatunek rozwija się na różnych pożywkach np. na płycie żelatynowej, w kulturze kłutej lub kreskowej, żelatynowej lub agarowej itd. Rysunek jednak, jak to każdy przyrodnik przyzna, nigdy dokładnie obrazu widzianego nie oddaje, zawsze jest w nim pewne tło podmiotowe albo jakiś szczegół ważny zostaje pominięty, to znowu nie należycie uwydatniony albo też przesadnie przedstawiony. Przeglądając też podręczniki bakterjologiczne począwszy od najdawniejszych rzadko kiedy możemy znaleźć rycinę oddającą wiernie obraz naturalny kultury czyto płytowej, czyto kreskowej tego lub owego gatunku bakterij. Tak samo i tablice z ilustracjami kolorowanymi lub niekolorowanymi dołączone do wielu podręczników, jak i atlasy bakterjologiczne mają wiele niedokładności, a niektóre ryciny wprost rażą fachowego bakterjologa.

Jedynie przez zastosowanie fotografii można otrzymać wierne obrazy kolonii bakteryj na kulturach płytowych jak i hodowli kłutych kreskowych itp. Fotografiją posługują się wszyscy przyrodnicy, dlatego i bakteryologowie starają się ją do swoich potrzeb zastosować. Mikrofotografia zrobiła już wielkie postępy, tak że mamy zdjęcia mikrofotograficzne bez zarzutu, wprost idealne; natomiast makrofotografia tj. zdjęcia fotograficzne kultur pozostawiają jeszcze wiele do życzenia. Fotogramy hodowli bakteryj w podręczniku bakterjologii Dr. Karola Günthera (Einführung in das Studium der Bacteriologie), który pierwszy zajął się fotografowaniem kultur, rażą brakiem jednostajnego tła, reflexami na probówkach, a nadto często niedokładnością szczegółów. Te same zarzuty podnieść by można co do atlasu E. Macé'go (Atlas de Microbiologie. Paris, 1898).

Uznając potrzebę wzorowych ilustracyj kultur dla nauki bakterjologii, zająłem się tą sprawą i po dłuższych próbach wynalazłem metodę fotografowania każdego rodzaju hodowli bakteryj, którą w niniejszej pracy szczegółowo opiszę. Uzyskane przezemnie obrazy są tak dokładne i tak wiernie, tak najdrobniejsze i najsubtelniejsze szczegóły oddają, że zdaniem mojem nic nie pozostawiają do życzenia.

Do fotografowania według mojego sposobu nadają się najlepiej kultury kłute kreskowe, płytowe, zwłaszcza bakteryj nierozpływających, chociaż z pewną modyfikacją możemy według tej samej zasady fotografować zarówno kultury płytowe z bakterjami rozpływającymi jak hodowle na ziemniakach itd. Posługuję się zwykłym przyrządem fotograficznym (16 : 21 cm.), rozciągalnym na 39 cm., zaopatrzonym w aplanat Steinheila (w średnicy dawnych 19 linii). Fotografowanie odbywa się w pokoju przy świetle wpadającym; w tym celu dolną szybę okna zasłania się czarnym papierem, po nad nią zaś leżącą górną szybę pokrywa się przezroczystą, jasną kalką, która łagodząc działanie promieni słonecznych zastępuje tu matową szybę. Za pomocą przytrzymańki umieszcza się zwykłą probówkę np. z kulturą kłutą żelatynową przed czarnym tłem w odległości 25 — 50 ctm. od szyby. Na tem tle występują dokładnie wszystkie szczegóły w kulturze oświetlonej ze wszystkich stron złagodzone światłem słonecznym. Następnie ustawia się aparat fotograficzny przed kulturą; ponieważ jednak obraz wypadłby za mały przy zupełnem nawet rozciągnięciu miecha, a zdjęcie chcemy mieć wielkości naturalnej, zatem z przodu przyrządu fotograficznego przytwierdza się szczelnie (przez wśrubowanie) nasadkę tj. rodzaj skrzyneczki na 17 cm. długiej, w której dopiero utwierdza się $7\frac{1}{2}$ cm. długi tubus z soczewką. Przy długości kamery wynoszącej około około 64 cm. po wsunięciu między miech a tubus nasadki otrzymuje się na szybce matowej aparatu fotograficznego obraz kultury wielkości naturalnej. Celem ułatwienia w uzyskaniu ostrego obrazu ze wszystkimi szczegółami przyklepia się na próbetce w części zawierającej hodowlę, karteczkę z najdrobniejszym drukiem

i następnie fiksuje na szybie matowej, a skoro się druk wyraźnie czyta, to się aparat ustala, zakłada kasetkę z płytkami 9 : 12 Lumière'a i po zdjęciu zasłony exponuje. Z początku trwało to z 5 minut; okazało się jednak, że niektóre obrazy były za długo na działanie światła słonecznego wystawione (przeexponowane) i że dla otrzymania znakomitych obrazów wystarczała ekspozycja przy stanie nieba pogodnym lub białych chmurach 20 — 25 sekund. Wywoływanie obrazów ujemnych (negatywów) odbywa się w ciemnicy za pomocą zwykłych, obecnie używanych wywoływaczy, jak hydrochinonu metolu lub glicyny a następnie po ustaleniu i wysuszeniu negatywu powleka się je lakiem. Negatywy te służą do otrzymywania obrazów dodatnich (pozytywów); mając zbiór diapozytywów tj. fotogramów kultur bakterii można sporządzić wielkie przezrocza (witraże), które zawieszane przed oknem mogą służyć jako okazy dla poglądowej nauki bakteriologii. Z licznych fotogramów

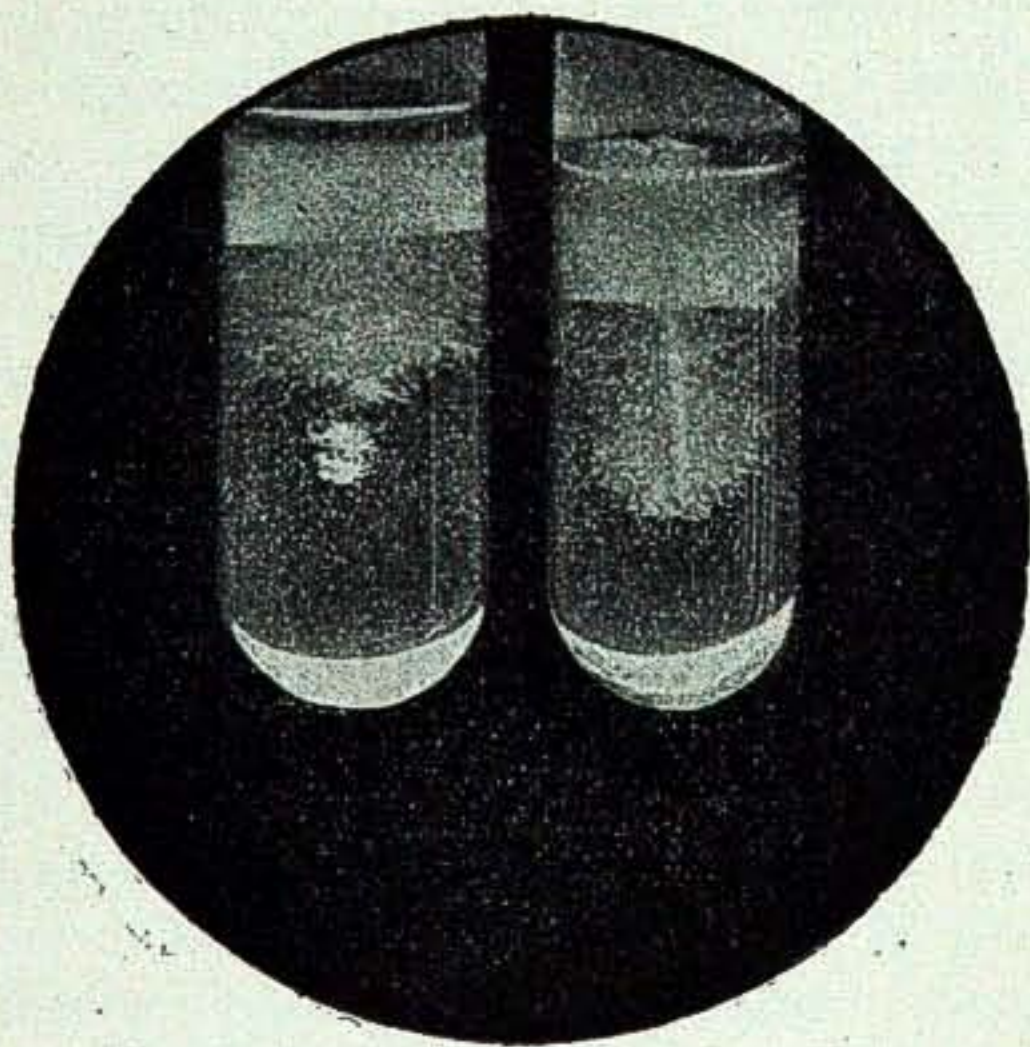


Fig. I. Bacillus Anthracis. (prątek węglkowy).
5-dniowa kultura kłuta żelatyn. Wielkość natur. 1 : 1.

dołącza się na okaz (Fig. I.) fotogram hodowli prątka węglkowego (*Bacillus Anthracis*); na tle jednostajnie czarnem występuje kultura kłuta 5-dniowa w zwykłej próbeczce z żelatyną, w której oprócz rozplłynienia w szerz żelatyny w górnej części widać poniżej wzdłuż ukłucia istną pilśn nitkowatą, tworzącą wypustki.

Fototypia, tu na miejscu sporządzona nie oddaje jeszcze wiernie wszystkich szczegółów, jakie widzimy na negatywach i dyapozytywach w naszym posiadaniu będących.

dotychczas wyłącznie na agarze skośnym zakładano. Otrzymanie wcale dobrych obrazów takich kultur jest możliwe, ale trzeba być przygotowanym, że jeżeli ufixuje się na szybce matowej obraz kultury na grubszej tj. dolnej części pożywki agarowej, to górna część nie wyjdzie dokładnie i odwrotnie; dlatego fixuje się środkową część kultury, która wyjdzie ostro, górna zaś, a szczególnie dolna część, wypadną już mniej wyraźnie. Główne więc zło tkwi w tem, że pokład agaru jest skośny tj. od góry ku dołowi przedstawia klin coraz grubszy, który zatem nie może być jednostajnie prześwieconym. Chcąc to usunąć sporządziłem próbówki, które po jednej stronie w górnej trzeciej części tj. tuż za końcem dolnym czopka waty okazują mostkowato wsterczające do środka

wpuklenie ściany. Próbetki te (Fig. II.) nadają się wybornie do kultur kreskowych. Po wlaniu pożywki (żelatyny, agaru lub surowicy) i wyjąłowieniu układa się je na równej powierzchni (tj. na pierwszym lepszym stole); nie potrzeba więc osobnych przyrządów do krzepnięcia w skośnym t. j. pochyłym położeniu (pożywka płynna zatrzymując się na mostku układa się równo i równoległe do ściany próbetki. W tych próbkach oszczędza się pożywek, a mimo to uzyskuje się znaczną powierzchnię dla rozwoju bakteryj. Wygodne jest także w tych próbkach szczepienie. Igłę platynową zagina się na końcu pod postacią bagnetu tj. w dwa zgięcia kolankowe i wprowadza się ją aż do dna próbetki, a oparłszy trzonek tj. pręcik o mostek szczepi się linijnie jakby się płużkiem orało. Hodowle kreskowe w tych próbkach mego pomysłu z powodu jednostajnej grubości pożywki i należytego przeświecenia nadają się szczególnie do fotografowania w świetle przepuszczającym t. j. według mojej wyżej opisanej metody. Otrzymaliśmy w ten sposób jasne, ostre i wyraziste obrazy wszelkich gatunków kultur.



Fig. II.

Fotografowanie kultur płytowych z koloniami pleśni, drożdży i bakteryj nierozpływających udaje się równie dobrze według tej samej procedury, a nawet kolonie bakteryj rozpływających można w ten sposób fotografować, jak długo są jeszcze młode i rozplynie dopiero się zaczęło; gdy jednak kolonie są większe i płytkę postawi się pionowo, to rozplyniona żelatyna zacznie się rozlewać, spływać i dlatego trzeba taką płytkę umieścić na płycie czarnej, matowej przed szybą zasłoniętą kalką i aparat fotograficzny skośnie i ku dołowi na nią skierować. To samo tyczy się fotografowania kultur na ziemniakach, a równie zwierząt doświadczalnych padłych skutkiem szczepienia różnymi bakteriami.

Według mojej metody wykonane zdjęcia hodowli bakteryj, przeniesione na papier matowy, nieco ziarnisty, dadzą się łatwo kolorować i w ten sposób można otrzymać zupełnie wierne obrazy kultur, które dołączone do opisu umożliwiłyby zarówno należyte poznanie własności poszczególnych gatunków bakteryj jak porozumienie się bakterjologów co do tożsamości lub też nieidentyczności opisywanych przez nich bakterji. Z tych to powodów mogę zalecić moją metodę fotografowania kultur jako najodpowiedniejszą, która wszelkim wymagom co do ścisłości i dokładności naukowej w zupełności zadość czyni.

