

Über die Bedeutung der Züchtungsbedingungen für das In-Erscheinung-treten haemin-autotropher Zellen in einem haemin-heterotrophen Mikrokokkenstamm*

Von J. JENSEN**, I. PAHLBERG, E. THOFERN und H. WORATZ

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Göttingen (Direktor: Professor Dr. F. SCHÜTZ †)

(Z. Naturforschg. 12 b, 500—506 [1957]; eingegangen am 19. März 1957)

In Reinkulturen einer haemin-heterotrophen Variante des Staphylokokkenstammes *Micrococcus pyogenes* var. aureus S. G. 511 treten unter bestimmten Bedingungen haemin-autotrophe Keime auf, welche die haemin-heterotrophen völlig verdrängen.

Paralleluntersuchungen mit verschiedenen Nährmedien wie Bouillon, Blut-, Haemolysat- und Protohaemin-Bouillon ergaben, daß die haemin-autotrophen Keime nur in der haeminfreien Bouillon in Erscheinung treten.

Überwachungsversuche bei gleichzeitiger Einsaat von haemin-autotrophen und haemin-heterotrophen Bakterien ergaben, daß in protohaemin-freien flüssigen Substraten die haemin-autotrophen, in protohaemin-haltigen flüssigen Substraten hingegen die haemin-heterotrophen Bakterien die Oberhand behalten.

1952 fanden JENSEN und THOFERN⁶ in einer streptomycin-resistenten Variante des *Micrococcus pyogenes* S. G. 511 einen haemin-heterotrophen Bakterienstamm.

Die Variante VAR zeichnete sich durch ihr hauchdünnes Wachstum auf haeminfreiem Nähragar aus, während sie sich auf Blutagar und in Bouillon hinsichtlich ihres Wachstums nicht von ihrem Ausgangsstamm A unterschied, welcher auf festen Nährböden stets in fetten, gelben Kolonien auftrat.

Abgesehen von der Streptomycin-Resistenz und der Haemin-Heterotrophie galt für VAR noch ein weiteres von A abweichendes Merkmal: Die Variante besitzt weder die Fähigkeit, eisenhaltige Atmungsfermente noch Katalase zu synthetisieren; beides war dagegen nach Haeminangebot möglich.

Die Variante unterschied sich also von ihrem Ausgangsstamm hinsichtlich der Streptomycin-Resistenz, der Haemin-Heterotrophie sowie des Fehlens der genannten eisenhaltigen Fermente.

Beide Stämme sind gleichartig im Hinblick auf ihre morphologischen und färberischen Eigenschaften, die Zuckervergärung, die Plasmakoagulase-Reaktion, die haemo-tryptischen Fermente und die Phagenempfindlichkeit⁶.

Weitere Untersuchungen ergaben, daß die Variante in haeminfreien Nährmedien das Apoferment der Katalase und mindestens einen Teil des Proteinanteils des Cytochromsystems bildet, und daß sie imstande ist, nach Zugabe von Protohaemin in ruhendem Zustand das Holoferment zu komplettieren. Der Nachweis wurde geführt durch spektroskopische Untersuchungen und Messungen des O₂-Verbrauches mit der Warburg-Apparatur.

Ähnliche Erscheinungen wie die für VAR beschriebenen wurden inzwischen von BELJANSKI¹ an haemin-heterotrophen Coli-Bakterien bestätigt.

Nach Auffindung der streptomycin-resistenten Variante im Jahre 1952 wurde sie durch fortgesetzte Passagen kultiviert. Entsprechend ihrer Wachstumseigenschaften erfolgte die Züchtung auf 5-proz. Schafblutagar, in Fleischwasser-Pepton-Bouillon mit 1% Glucose und in der gleichen Bouillon mit 1000 Einheiten Streptomycin/ml. Die Kulturen aus den flüssigen Nährmedien sowie die Kultur von der Blutplatte wurden nach 24-stdg. Bebrütung bei 37° auf gewöhnlichem Nähragar hinsichtlich ihrer Haeminbedürftigkeit geprüft.

Das Schema zeigt die Methode des Überimpfens: Es wurde jeweils eine viertel Öse der Kolonien von

* Herrn Professor Dr. F. LENZ zum 70. Geburtstag gewidmet.

** Dpt. of Bacteriology, Marquette University, School of Medicine, 561 North, 15th Street Milwaukee, 3/Wisconsin USA.

¹ M. BELJANSKI, C. R. hebdomadaire Séances Acad. Sci. **240**, 374 [1955].

² W. BRAUN, Bacterial Genetics, Philadelphia 1953, S. 63, 150, 153.

³ W. BRAUN u. Mitarb., J. Bacteriol. **62**, 45 [1951], referiert im Zbl. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankh. Hyg., I. Abt., Ref. **154**, 206 [1954].

⁴ M. I. BUNTING, J. Bacteriol. **43**, 593 [1942], referiert in W. BRAUN, Bacterial Genetics, S. 154.

⁵ G. GILLISSEN, Zbl. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankh. Hyg., I. Abt., Orig. **159**, 187 [1952/53].

⁶ J. JENSEN u. E. THOFERN, Z. Naturforschg. **8b**, 599, 604, 697 [1953]; **9b**, 596 [1954].

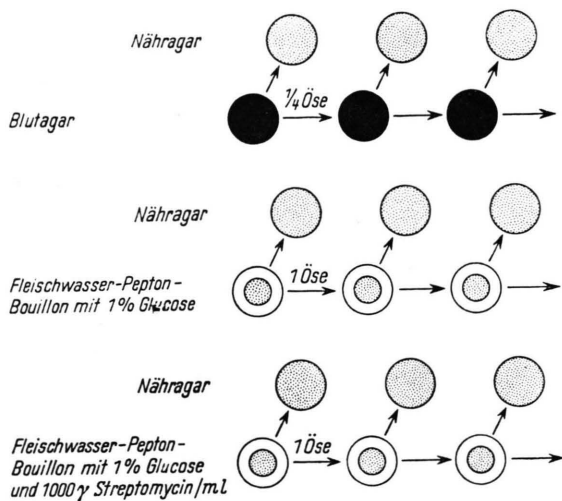


Abb. 1. Beschreibung s. Text.

der Blutagarplatte wiederum auf einer Blutplatte und auf einer Nähragarplatte ausgestrichen. — Ferner wurde je eine Öse, nach gutem Durchmischen der Flüssigkeit, von der Glucosebouillon in das nächste Glucosebouillon-Röhrchen und auf eine Nähragarplatte gebracht, wo die übertragenen Bakterien mit einem sterilen Glasspatel verteilt wurden. — In der gleichen Weise ist mit den Bakterien aus streptomycinhaltiger Bouillon verfahren worden. Auch hier wurde jeweils eine Öse in das gleiche Medium und auf eine Nähragarplatte gebracht, wo das Substrat ebenfalls mit einem Spatel ausgestrichen wurde.

Es zeigte sich, daß von 191 Passagen 20 Kulturen (13 Kulturen aus Glucosebouillon, 7 Kulturen aus Glucose-Streptomycin-Bouillon) neben den zahlreichen hauchdünnen VAR-Kolonien vereinzelte fette Keime aufwiesen, welche sich hinsichtlich ihres Wachstums wie der Ausgangsstamm A verhielten. Nähere Untersuchungen dieser Kolonien auf die oben dargestellten für VAR und A charakteristischen Eigenschaften hin ergaben, daß diese vereinzelten Keime mit dem Ausgangsstamm A die Haemin-Autotrophie und die Katalase-Aktivität gemeinsam haben — aber wie VAR streptomycin-resistent sind.

Es handelt sich hier also um einen gänzlich neuen Stamm, den wir mit J1 bezeichnen und für den die drei Merkmale — Streptomycin-Resistenz, Haemin-Autotrophie und Katalase-Aktivität — als Kriterium gelten.

Es sei in diesem Zusammenhange betont, daß auch die weiter unten mit J1 bezeichneten Formen

nur auf diese drei Eigenschaften hin geprüft wurden.

Während also aus Glucosebouillon und Glucose-Streptomycin-Bouillon einzelne haemin-autotrophe, katalase-positive, streptomycin-resistente Kolonien auftraten, welche bei weiteren Passagen schnell zunahmen und die haemin-heterotrophen Ausgangskulturen überwuchsen, wiesen dagegen die von Blutagar auf Nähragar geprüften Kulturen stets nur hauchdünnes Wachstum auf.

In Vorversuchen hatte man diese Verhältnisse zu klären gesucht. Man fand auch hier innerhalb einer Bouillon-Passage Umschläge von VAR nach J1, während die Blutbouillon-Reihe keine Veränderungen zeigte. Da bei diesen Experimenten die Einsaat nicht definiert und die Ergebnisse nicht sicher reproduzierbar waren, erfolgten systematische Untersuchungen, die weiter unten beschrieben sind.

Bevor auf die Methodik der Untersuchungen näher eingegangen wird, sei an dieser Stelle auf die Faktoren hingewiesen, die es berechtigt erscheinen lassen, J1 als *Mutante* anzusprechen:

1. Die VAR-Bakterien zeigen in protohaemin-freien Nährböden eine *plötzliche Wachstumsänderung*.
2. Es erfolgt kein Massenumschlag, sondern nur ein *vereinzelt Auftreten* von J1.
3. Wenn J1 aufgetreten ist, dann zeigt er ein *konstantes Verhalten*.

Unter der Voraussetzung, daß es sich bei J1 um eine Mutante handelt, kommen wir zu folgenden *Fragestellungen* hinsichtlich des Milieueinflusses:

1. Ist das Auftreten von J1, das offenbar nur in Abwesenheit von Protohaemin stattfindet, die Folge einer *Selektion* oder
2. mutiert VAR in protohaemin-haltigen Nährböden, welche komplettes Wachstum gewährleisten, etwa gar nicht?

Eine Bejahung der zweiten Frage wäre mit der Mutationslehre unvereinbar.

Methodik

Um einer Klärung dieser Fragen näherzukommen, wurden zunächst Reihenpassagen in Bouillon, Blutbouillon, Haemolysat-Bouillon und in Protohaemin-Bouillon angelegt.

Es wurde methodisch folgendermaßen vorgegangen: 20 Röhrchen mit je 5 ml Fleischwasser-Pepton-Bouillon und einem Zusatz von 0,15 ml einer 20-proz. Glucoselösung wurden mit VAR-Keimen einer Blutplattenkultur beimpft und 24 Std. bei einer Temperatur von

37° bebrütet. Diese 20 Stämme (a1 bis t1) dienten als Ausgangskulturen für 50 Subkulturen, die alle unter gleichen Wachstumsbedingungen wie ihre Ausgangsstämme gehalten wurden. Eine Öse des Bodensatzes wurde in das nachfolgende Kulturröhrchen gebracht. Die Testung erfolgte auf einer halben Nähragarplatte, auf welche eine Öse der zu prüfenden Suspension übertragen und mit einem Spatel ausgestrichen wurde. Die Bebrütungszeit der Platten betrug 24 Std. bei 37°.

Am Ende der gesamten Versuchsreihe zeigte es sich, daß nach 50 Passagen von 19 VAR-Kulturen 9 von J1 überwachsen waren. Die VAR-Kultur d fiel nach der fünften Passage aus (s. Tab. 2). Der neue Stamm trat zunächst in vereinzelt Kolonien auf, welche bei den nächst folgenden Passagen zunahm, um schließlich VAR restlos zu verdrängen.

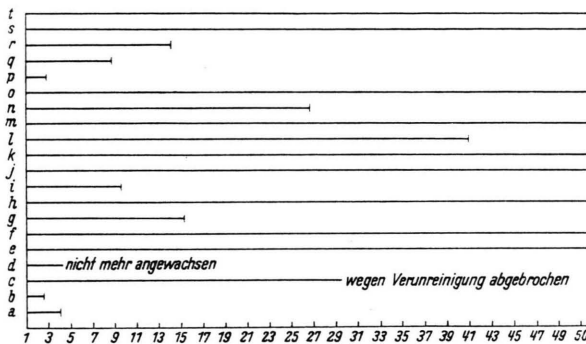


Abb. 2. Umschläge von VAR zu J1 in Glucose-Bouillon. Die Abszisse stellt die Anzahl der Passagen dar, die Ordinate die VAR-Stämme a bis t in Glucose-Bouillon. Jeder Querstrich bedeutet einen Umschlag von VAR nach J1.

Die Häufigkeit des Auftretens von J1 erfolgte anscheinend unregelmäßig. Sie konnte nicht auf einen Mittelwert hinsichtlich der Verteilung auf jeweils 10 Passagen gebracht werden, denn es ergaben sich innerhalb der ersten 10 Passagen 4 Umschläge, von der 10. bis zur 20. Passage 3 Umschläge, von der 20. bis zur 30. und von der 30. bis zur 40. jeweils ein Umschlag. Eine deutliche Abnahme des Auftretens von J1 nach dem Ende der Versuchsreihe hin wurde beobachtet.

Die in Erscheinung tretenden haemin-autotrophen Mikrokokken waren bis auf eine Ausnahme, nämlich die Passage 1, streptomycin-resistent und entsprachen damit der früheren Definition von J1. Nur aus der Kultur 1 kamen haemin-autotrophe Kokken mit typischer Pigmentbildung und Katalasevermögen; jedoch es fehlte das Merkmal der Streptomycin-Resistenz gegen 1000 γ /ml. (Die Streptomycin-Resistenz lag unter 10 γ /ml.) Damit steht zur Diskussion, ob es sich hier um eine Verunreinigung oder um eine Form handelt, die im Sinne einer Rückmutation von VAR zu A zu deuten wäre. Diese Frage wäre sehr schwer zu entscheiden und ist für die vorliegende Fragestellung nicht von Bedeutung.

Wird diese umgeschlagene Kultur 1 in 1000 γ /ml Streptomycin-Bouillon gebracht, so ist nach 24 Std. kein Wachstum, nach 48 Std. hingegen schwaches Wachstum vorhanden. Die nächste Subkultur auf Agar zeigte das hauchdünne, für VAR charakteristische Wachstum.

Dieser Befund ist wohl am ehesten so zu verstehen, daß innerhalb der haemin-autotrophen Population haemin-heterotrophe VAR-Individuen mitgeführt werden, durch die Streptomycin-Bouillon selektioniert, sich nun allein entwickeln können.

Dies würde dafür sprechen, daß vielleicht auch sonst bei dem Umschlag zu J1 immer noch einzelne VAR-Kulturen vorhanden sein können, dort aber infolge der gleichzeitigen Resistenz von VAR und J1 gegenüber Streptomycin nicht in Erscheinung treten.

Die Kultur c mußte nach der 30. Passage abgebrochen werden, da sie durch katalase-positive, aber nicht streptomycin-resistente weiß wachsende Kokken verunreinigt war. Es gelang zwar auch hier durch Kultivierung in 1000 γ /ml Streptomycin-Bouillon die Variante VAR wieder herauszuzüchten, die Reihe wurde aber nicht fortgesetzt, da sie methodisch hinsichtlich der fortlaufenden Bouillon-passage damit unterbrochen war.

Dieser Versuchsreihe in Bouillon lief eine Blut-Bouillon-Passage parallel: Den je 4,5 ml Bouillon enthaltenden Röhrchen wurden jeweils 0,5 ml eines 25-proz. defibrinierten Schafblut-haemolysates zugesetzt. (In Vorversuchen hat es sich gezeigt, daß diese Konzentration gutes Wachstum ermöglicht.) Es wurden wiederum 20 Schwesterkulturen angelegt, die ebenfalls über 50 Passagen verfolgt und auf Agarplatten hinsichtlich ihrer Haemin-Autotrophie geprüft wurden. Als Ausgangsstamm diente die gleiche Blutplatten-Kultur wie für die oben beschriebenen Versuche.

Bei diesen Vollbluthaemolysat-Passagen trat im Gegensatz zu Bouillon niemals ein Umschlag nach J1 auf.

Um ein Aufbringen von zu viel Haemoglobin auf den Agar zu vermeiden, wurde folgende Methode angewandt: Aus dem Bodensatz des Röhrchens wurde eine Öse Bakterien auf den Agar gebracht und mit einem Spatel auf der halben Platte verteilt. Dabei war die Verdünnung des Haemoglobins so stark, daß VAR nur noch als Hauch wachsen konnte. Eventuell auftretende

J1-Kolonien hätte man dann ebenso wie einzeln stehende Verunreinigungen gut erkennen können. Katalase-positive Kolonien, die mitunter auf solchen Agarplatten beobachtet wurden, erwiesen sich stets als Verunreinigung durch Keime aus der Raumluft. Sie wurden abgegrenzt durch mikroskopische Präparate, Wachstum auf Blutagar, Prüfung der Streptomycin-Empfindlichkeit in Bouillon mit 1000 γ /ml Streptomycin und Koagulaseprobe.

Nachdem in Vollbluthaemolysat-Passagen kein Umschlag nach J1 erfolgt war, wurde zur Einengung des wirksamen Prinzips Vollblut fraktioniert. Entsprechend der Haemin-Heterotrophie von VAR wurde die haemoglobin-führende Erythrocyten-Fraktion verwandt:

Schaferythrozyten wurden durch 5-maliges Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung auf der Zentrifuge von ihren Serumresten befreit. Nach Hämolysen mit ca. 100 ml doppelt dest. Wasser wurden die Stromata der Erythrozyten auf einer hochtourigen Zentrifuge abgetrennt, das überstehende Hämolysat dekantiert und durch Seitz-E. K.-Schichten filtriert. Der Zusatz erfolgte wie bei der Vollbluthaemolysat-Bouillon.

Die Ergebnisse von 50 Passagen sind analog denen aus Vollbluthaemolysat-Bouillon, d. h. auch hier wurde niemals ein Umschlag nach J1 gesehen.

Da wir mit Hämolysat die gleichen Ergebnisse erhielten wie mit Vollblut, bekam die nächste Bouillonpassage reines Protohaemin, frei von anderen Blutbestandteilen, zugesetzt. Das Protohaemin wurde nach SCHALFEJEW^{*,7} gewonnen und war zweifach umkristallisiert. Dem Röhrchen mit 5 ml Bouillon wurden je 25 γ Protohaemin entsprechend $7,7 \cdot 10^{-6}$ -m. zugesetzt.

Auch hier erfolgte niemals ein Auftreten der haemin-autotrophen Mutante. (Wegen der Eindeutigkeit der Ergebnisse kann auf eine tabellarische Darstellung der eben beschriebenen Versuche verzichtet werden.)

Alle bisher erörterten Experimente zeigten, daß die Mutation zu J1 nur in einem Milieu ohne Protohaemin in Erscheinung trat. Das Nichterscheinen von J1 in protohaemin-haltigen Nährmedien läßt an folgende Gründe denken:

Erstens: Die Mutante entsteht, wird aber infolge der besseren Wachstumsmöglichkeiten von VAR überwachsen.

Zweitens: Die Mutation entsteht gar nicht erst bei Protohaemin-Gegenwart, weil dann für VAR der Reiz entfällt, die Haematinfermente selbst zu synthetisieren.

Einer direkten experimentellen Untersuchung ist nur die erste Hypothese zugänglich.

Da Vorversuche mit nicht näher definierten Einsaatmengen gezeigt hatten, daß aus einer künstlichen Mischung von J1 und VAR nur J1 in Bouillon heranwächst, wurden nur Wachstumsversuche mit definierten Mischungen durchgeführt.

VAR- und J1-Kulturen, in Bouillon gezüchtet, wurden nephelometrisch auf gleiche Dichte eingestellt. Als Ausgangsstämme dienten eine beliebige J1-Kultur und eine VAR-Kultur von der Blutplatte. Wir stellten von der J1-Suspension fünf Verdünnungen in physiologischer NaCl-Lösung her. Die Konzentrationen verhielten sich gegenüber VAR wie 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} . Es wurden 0,1 ml jeder Verdünnung des J1-Stammes zusammen mit 0,1 ml stets gleichbleibender Konzentration von VAR in Bouillon, Blutbouillon, Haemolysat-Bouillon und in Protohaemin-Bouillon gebracht. In weiteren Passagen wurde nachgeprüft, welcher der beiden Stämme die Oberhand behielt.

Methodisch wurde folgendermaßen verfahren: Nach gutem Durchmischen der Bouillon wurde eine Öse auf das nächste Röhrchen übertragen, 0,1 ml mit Hilfe einer Pipette auf eine ganze Agarplatte gebracht und die Suspension mit einem Glasspatel gleichmäßig auf dem Agar verteilt. Zur Kontrolle wurde J1 in allen Konzentrationen allein in Bouillon geimpft.

Diese Versuche führten zu folgendem Ergebnis: In Bouillon wurde VAR von allen Verdünnungen des J1 schon nach fünf Passagen restlos überwachsen.

Anders hingegen war das Verhalten in Blut-, Haemolysat- und Protohaemin-Bouillon. Hier verschwand J1 nach kurzer Zeit und zwar abhängig von der eingebrachten Keimzahl. Die Keimzahl wurde durch Auszählung bestimmt. Es wurden 0,1 ml jeder Verdünnung auf der Agarplatte verstrichen. Die Zählung ergab 70 Keime für die höchste Verdünnungsstufe. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors berechneten sich für die Verdünnung 10^{-6} 700 Keime, für 10^{-5} 7000, für 10^{-4} 70 000, für 10^{-3} 700 000 Keime.

In der Regel war nach maximal 8 Passagen die Mutante J1 in allen protohaemin-haltigen Medien von VAR überwachsen. Nur die letzten zwei Versuchsreihen in Protohaemin-Bouillon — J1:VAR = 10^{-6} :1 und J1:VAR = 10^{-7} :1 — zeigten stets vereinzelte J1-Keime. Dieses abwegige Verhalten konnte durch die Experimente nicht geklärt werden.

* Die Präparate wurden uns freundlicherweise von Herrn Dr. STEGEMANN, Med. Forschungsanstalt der Max-Planck-Gesellschaft Göttingen, zur Verfügung gestellt.

⁷ SCHALFEJEW, in: GATTERMANN-WIELAND, Die Praxis des organischen Chemikers, S. 373, Berlin 1947.

Um zu zeigen, daß J1 völlig verschwunden war, wurde mit einer Pipette möglichst das gesamte Sediment der letzten Subkultur in gewöhnliche Bouillon verbracht und die nächste Passage auf der Agarplatte geprüft. Auf Grund der früheren Untersuchungen konnte vorausgesetzt werden, daß in diesem Milieu selbst vereinzelte J1-Keime Gelegenheit haben müßten, heranzuwachsen und damit nachweisbar zu werden. Aber auch mit dieser Methode wurde keine J1-Kolonie mehr festgestellt. (Auf die Wiedergabe der umfangreichen Protokolle wird verzichtet. Sie können Interessenten jederzeit zur Verfügung gestellt werden.)

Unter Berücksichtigung der Befunde läßt sich hinsichtlich der zuvor erwähnten Hypothesen sagen, daß selbst dann, wenn die Einsaat von J1 um mindestens vier Zehnerpotenzen höher liegt als die durchschnittlichen Mutationsraten, bereits nach wenigen Passagen das Wachstum völlig unterdrückt wird.

Wenn es sich auch nicht nachweisen läßt, daß J1 in protohaemin-haltigen Nährböden entsteht, so wird durch diese Versuche doch die zweite der oben aufgeführten Hypothesen recht unwahrscheinlich. Die einleuchtendere Erklärung für das Fehlen von J1 in protohaemin-haltigen Nährböden bleibt somit die Selektion zugunsten von VAR. Diese Erklärung steht in vollem Einklang mit der Mutationslehre, und es gibt eine ganze Reihe ähnlicher — obwohl nicht so krasser — Beispiele in der Literatur:

Bei *Salmonella typhimurium* bewirkt die Aminosäure Threonin den Übergang in Formen, die sich durch erhöhte Threonin-Verträglichkeit und größere Virulenz gegenüber der Ausgangsform auszeichnen.

Ein noch nicht isoliertes Stoffwechselprodukt bewirkt in Kulturen von *Pasteurella tularensis* das Auftreten einer Mutante mit verändertem Koloniebild und veränderter Virulenz. Dem Populationswechsel in Kulturen von *Mycobacterium tuberculosis*, *Corynebakterium diphtheriae* und *Shigella dysenteriae* sollen ähnliche biochemische Vorgänge zugrunde liegen.

Von BUNTING⁴ sind für den Farbwechsel der Kolonien von *Serratia marcescens* ebenfalls Stoffwechselfaktoren verantwortlich gemacht worden (BRAUN und Mitarb.³).

Um sicher zu gehen, daß die Blut- bzw. Haemolysat-Bouillon keine für J1 hemmenden Substanzen besitzt, wurde J1 allein in beiden Substraten gezüchtet und durch Ausstreichen auf Agar das Wachstum hinsichtlich Haemin-Autotrophie geprüft.

Über 8 Passagen zeigte J1 keine Änderung seiner Wachstumseigenschaften. Die Nährmedien waren gut und gleichmäßig bewachsen.

In der gleichen Zeit also, in der J1 beim Zusammenwachsen mit VAR aus diesen Substraten verschwand, zeigte er beim alleinigen Kultivieren keine Veränderungen.

Weiterhin wurde die Möglichkeit einer eventuellen gegenseitigen Hemmung von VAR und J1 durch Lochplatten-Versuche und durch kreuzweises Beimpfen beider Stämme geprüft:

1. *Agarlochtest für VAR-Bouillon und VAR-Sediment:* J1-Suspensionen in Bouillon gezüchtet wurden auf Nähragar und auf Blutagar ausgespatelt. Jede Platte erhielt vier Stanzlöcher, in welche mit einer Pipette Blutbouillon, Haemolysat-Bouillon sowie VAR-Sediment von Blutbouillon und VAR-Sediment von Haemolysat-Bouillon gebracht wurde. Nach 24 Stdn. Bebrütung bei 37° konnten keine Hemmhöfe beobachtet werden.
2. *Agarlochtest für J1-Bouillon und J1-Sediment:* Das gleiche Experiment wurde an J1-Bouillon und -Sediment durchgeführt, wobei VAR, ebenfalls in Bouillon gewachsen, auf Nähragar und auf Blutagar verteilt wurde. In den Stanzlöchern befand sich Blutbouillon, Haemolysat-Bouillon, J1-Sediment von Blutbouillon und J1-Sediment von Haemolysat-Bouillon. Auch hier zeigten sich keine Hemmhöfe.
3. *Kreuzweises Beimpfen von VAR und J1:* Auf der Blutagarplatte wurde in einem Impfstich die Variante VAR aufgetragen und in senkrechter Richtung dazu J1 ausgestrichen mit dem Ergebnis, daß VAR sowie J1 ungehindert wuchsen.

Es ist bekannt, daß zum Beispiel hemmende Substanzen in sehr viel niederen Konzentrationen in flüssigen Nährböden wirken als auf festen. Diese Erscheinung ist durch die verschiedenen Stoffwechselwege der Bakterien in Abhängigkeit von den Züchtungsverhältnissen bedingt (THOFERN⁸, WORATZ und THOFERN⁹).

Das würde heißen, daß eine Substanz, die in unbelüfteten flüssigen Nährböden hemmt, bei Einwirkung auf Bakterien, die auf der Agarplatte wachsen, von diesen Bakterien abgebaut werden kann und dadurch ihre Hemmwirkung verliert. Diese

⁸ E. THOFERN, unveröffentlichte Versuche.

⁹ H. WORATZ u. E. THOFERN, Arch. Hyg. Bakteriell. **140**, 176 [1956].

Untersuchungen gestatten nur die Aussage, daß sich mit den von uns angewandten Methoden eine Hemmsubstanz nicht nachweisen ließ, was aber kein Beweis dafür ist, daß diese Hemmsubstanz in flüssigen unbelüfteten Nährmedien nicht vorhanden sein kann.

Besprechung der Ergebnisse

Bei der Betrachtung der Reihenpassagen von VAR in Glucosebouillon, Blut-, Haemolysat- und Protohaemin-Bouillon ist besonders auffällig, daß nur in dem ersten Substrat das Auftreten haemin-autotropher, streptomycin-resistenter Mikrokokkenkulturen beobachtet werden konnte. Damit wurden die früheren Ergebnisse der Reihenpassagen in Bouillon und 1000 γ -Streptomycin-Bouillon sowie auf Blutagar bestätigt, wo der neue Stamm J1 nur in Bouillon und in 1000 γ -Bouillon, nicht aber in haeminhaltigen Nährböden in Erscheinung trat. Die Abgrenzung der neu auftretenden Form gelingt, wie schon beschrieben, sehr leicht an Hand ihrer drei Merkmale: Streptomycin-Resistenz, gutes Wachstum auf der Agaroberfläche und die Fähigkeit der Kolonien, H_2O_2 zu zerlegen. Die zuletzt genannte Fähigkeit ist gegeben durch den Besitz eines spezifischen Haematinfermentes, der Katalase. Da JENSEN und THOFERN⁶ fanden, daß bei ausreichendem Protohaemin-Angebot stets die Komplettierung sowohl des Atmungssystems als auch der Katalase erfolgte, konnte im Rahmen dieser Untersuchungen der Nachweis der Katalase als Kriterium für die Ausbildung der gesamten Haematinfermente benutzt werden.

Die Ergebnisse der Experimente könnten bei der ersten Betrachtung zu dem Schluß führen, daß das plötzliche Entstehen haemin-autotropher Bakterien innerhalb einer sonst haemin-heterotrophen Population abhängig von der Gegenwart oder dem Fehlen dieses Wuchsstoffes wäre. Da man aber die Entstehung der haemin-autotrophen Bakterien als Mutation auffassen muß, würde diese Erscheinung gegen die zur Zeit gültige Definition der Mutation sprechen.

Eine Mutation ist

1. sprunghaft, d. h. plötzlich auftretend, und
2. in der Richtung durch Milieubedingungen nicht beeinflusbar.

Der erste Teil der Definition trifft auch für das Auftreten unserer haemin-autotrophen Art zu. Je-

doch zum zweiten Punkt der Definition scheinen die Ergebnisse in krassem Widerspruch zu stehen.

Bei Bakterien-Populationen ist nun der Einwand zu machen, daß solche Widersprüche durch verschiedene Wachstumsgeschwindigkeiten bedingt sein können. Nach BRAUN² kann der Wechsel einer Bakterien-Population von folgenden Faktoren abhängig sein:

1. Die Mutation der ursprünglichen Form zu der „besser adaptierten“ Form in Abhängigkeit von den Umwelteinflüssen.
2. Das Wachstum der Mutante in Abhängigkeit vom Wachstum der Ausgangsform.
3. Die Lebensfähigkeit der Mutante in Abhängigkeit von der Lebensfähigkeit des Ausgangsstammes.
4. Das Wachstum der Ausgangsform.
5. Die Lebensfähigkeit der Ausgangsform.

Dieses will sagen: Das „Nicht-in-Erscheinung-treten“ der haemin-autotrophen Bakterien braucht nicht abhängig zu sein von einem Nichtvorkommen dieser Mutation! Es können vielmehr bessere Wachstumsbedingungen der VAR-Population bei Angebot von Protohaemin sowie die geringe Mutationsrate von 10^{-6} bis 10^{-8} dafür verantwortlich sein, daß hier die haemin-autotrophe Form niemals weit genug heranwächst, um mit unseren Methoden erfaßt werden zu können.

Zur Klärung der eben geschilderten Verhältnisse wurden die im zweiten Teil der Methodik aufgeführten Versuche angestellt.

Diese Überwachungs-Versuche bestätigen den obigen Einwand. In Glucosebouillon wurde die haemin-heterotrophe Variante VAR vom haemin-autotrophen Stamm J1 überwachsen, selbst wenn dessen Zahl im Verhältnis zu VAR der Mutationsrate von etwa 10^{-7} entsprach. Erfolgte dagegen die simultane Einsaat von VAR und J1 in protohaeminhaltigen Nährmedien, wie Blut-, Haemolysat- und Protohaemin-Bouillon, so behielt stets VAR die Oberhand, auch dann, wenn die Zahl der J1-Bakterien um vier Zehnerpotenzen höher lag als die Mutationsrate.

Diese Ergebnisse lassen folgenden Schluß zu: Haemin-Autotrophie ermöglicht in einem Nährboden, der frei von Protohaemin und spaltbaren Kohlenhydraten ist, besseres Wachstum als Protohaemin-Autotrophie, wie sich für A und VAR bei Wachstum in Caseinpepton augenfällig erwiesen hat (JENSEN und THOFERN⁶).

In protohaemin-haltigen Nährmedien dagegen kann VAR seine Haematinfermente nach dem derzeitigen Stand der Untersuchungen ebenso gut ausbilden wie J1 und hat durch zahlenmäßige Überlegenheit die Oberhand.

Das Auftreten bzw. Nicht-Auftreten von J1-Bakterien konnte durch diese Untersuchungen geklärt werden. Es gelang aber nicht, einen Anhalt zu finden, warum die gleichzeitig eingepflichten J1-Bakterien bei den Überwachungs-Versuchen in den protohaeminhaltigen Nährböden im Verlaufe weniger Passagen völlig verschwanden. Der Nachweis einer durch VAR produzierten extrazellulären Hemmsubstanz konnte ebenso wenig erbracht werden, wie der einer gegenseitigen Beeinflussung ihres Wachstums bei kreuzweisem Ausstreichen auf der Blutagarplatte.

Die Beeinflussung der J1-Bakterien durch VAR gehört vielleicht in das noch weitgehend ungeklärte Gebiet der Symbiose und Antibiose von Bakterien-Mischkulturen. Eine ähnliche Erscheinung ist auch von Milzbrandbazillen bekannt, die mit *E. coli*-Kulturen zusammen kultiviert werden. Es kommt dabei zum Verschwinden des *Bacillus anthracis* (GILLISEN⁵).

Ferner wird von einer gegenseitigen Beeinflussung zwischen S- und R-Formen von *Brucella abortus* berichtet.

In Kulturen von *Brucella abortus* mit vorwiegend S-Formen kommt es zum Auftreten von R-Formen, die bei längerem Stehen der Kultur die Oberhand gewinnen. Dieses Phänomen ist durch Alanin bedingt. S-Zellen bilden während ihres Wachstums Alanin, das für sie selbst toxisch ist. R-Zellen hingegen sind für Alanin wenig empfindlich und bilden auch weniger Alanin. Durch dieses Stoffwechselprodukt wird die Vermehrung der S-Zellen gebremst, so daß sich die in der Minderzahl vorhandenen R-Zellen entwickeln können. In einer Mischkultur von überwiegend S-Formen wird daher mit dem Anstieg des Alanins gleichzeitig ein Anstieg der R-Zellen, und umgekehrt bei einer Mischkultur von vorwiegend R-Formen ein Anstieg der S-Zellen beobachtet (BRAUN und Mitarb.³).

Die Ergebnisse lassen für das Arbeiten mit VAR-Kulturen folgenden Schluß zu:

Um eine gleichmäßige haemin-heterotrophe Population zu erhalten, ist die Fortzüchtung des VAR-Stammes auf protohaemin-haltigen Nährböden erforderlich. Sie allein gewährleisten nach diesen Erfahrungen das Nichtauftreten von haemin-autotrophen Zellen, deren voll ausgebildete Haematinfermente die Versuche über die Komplettierung des Atmungssystems von VAR-Suspensionen in ruhen- dem Zustand nach Protohaemin-Zusatz stören würden.

Über die Biosynthese von Thymindesoxyribosid bei Bakterien

VON ADOLF WACKER und DÖRTHE PFAHL

Aus dem Organisch-chemischen Institut der Technischen Hochschule Berlin, Berlin-Charlottenburg
(Z. Naturforschg. **12 b**, 506—509 [1957]; eingegangen am 14. Mai 1957)

Wie mit Uridin uniform ¹⁴C markiert gefunden wurde, wandelt *B. coli* 113—3, sowohl mit Vitamin B₁₂ als auch mit Methionin als Wachstoffsstoff, die Base in Thymin und Cytosin um, dagegen nicht die Ribose in Desoxyribose.

In Fortführung der Arbeiten über die Biosynthese des Thymins¹ mit isoto- pen-markierten Verbindungen haben wir nunmehr auch mit Uridin-[¹⁴C] uniform markiert die Biosynthese des Thymindesoxyribosids untersucht.

Nachdem wir zeigen konnten, daß Uracil unter Mitwirkung von Folsäure in Thymin umgewandelt

wird, war es nun von Interesse, die Bildung der Desoxyribose näher zu studieren. Es lag nahe, in der Ribose einen Vorläufer der Desoxyribose, bzw. in den Ribosiden Vorläufer der Desoxyriboside² zu vermuten.

Bei der Bildung der Desoxyriboside dürfte dem Vitamin B₁₂ eine besondere Rolle zukommen. Wir

¹ F. WEYGAND, A. WACKER, A. TREBST u. O. P. SWOBODA, Z. Naturforschg. **9 b**, 764 [1954].

² P. M. ROLL, H. WEINFELD, E. CAROLL u. G. B. BROWN, J. biol. Chemistry **220**, 439 [1956]; P. M. ROLL, H. WEINFELD u. E. CAROLL, **220**, 455 [1956]; I. A. ROSE u. B. S. SCHWEIGERT, **202**, 635 [1950].