

SBORNÍK NÁRODNÍHO MUSEA V PRAZE

ACTA MUSEI NATIONALIS PRAGAE

Volumen XIII. (1957) No. 1—2

REDAKTOR ALBERT PILÁT

GERHARD FÄRBER—OLGA VONDROVÁ—EVA STREIBLOVÁ:

O morfologických a metabolických vlastnostech zon mikrobiálních makrokolonií (bakt.) na tuhých živných mediích

Vypracováno v oddělení mikrobiálních Sbírek Biologického ústavu ČSAV za vedení Akademie Dr. I. Má l k a, ředitele ústavu.

Über die morphologischen und metabolistische Eigenart der Zonenbildung mikrobieller Makrokolonien (bakt.) auf festen Nährböden

Diese Arbeit wurde in der Abt. Mikrobensammlungen des Biologischen Instituts der Cechosl. Akademie der Wissenschaften unter der Leitung des Direktors Akademie-mitgl. Dr I. Má l e k durchgeführt.

SOUHRN.

Podařilo se nám vypěstovat na různých tuhých mediích, která obsahují 5 %, 3 %, 2,5 % a 2 % suchého agaru (nejlépe však 2,5 %) (23), makrokolonie různých druhů a kmenů bakterií. Prozkoumali jsme spolutvářející bacily, chromabakterie, druhy skupiny *Pseudomonas* a *Acetobacter*.

Z těch jsme věnovali zvláštní pozornost oxydoredukčním kmenům, použitým v průmyslu, tedy kmenům *Pseudomonas* a *Acetobacter*. Nejcharakterističtější se jevil *Pseudomonas* „*cythro*“ (3). Tento druh tvoří na všech použitých půdách za 24 hodin tři, za delší dobu více zonálních vrstev, na nichž jsme po 24 a 48 hodinách rozeznali jako první zonu o k r a j, pak zvýšený val buněk a s t ř e d. Uvedenou zvýšenou vrstvu označujeme jako „*vicin*“ (z latinského *vicinus* - sousední).

Tyto vrstvy jsou jednotné a liší se od sebe značně, a to jak morfologicky (makroskopicky i mikroskopicky), tak i metabolistickou aktivností jejich subkultur.

Na optimální půdě pro *Pseudomonas* „*cythro*“, kterou je GAT (tab. III A) jsme u kmenů tohoto druhu pozorovali, že subkultury (isolokultury) 72 hodin staré při 28 °C založené, z vrstev makrokolonií *Ps.* „*cythro*“ jeví reprodukovatelné rozdíly. Ze všech těchto zon dává „*vicin*“ nejaktivnější výsledky subkultur.

U makrokolonií 72 hodin starých jsme pozorovali největší rozdíly v subkulturách za stejných podmínek, u 46 hodin starých nejaktivnější a nejvytrvalejší inokula pro další průmyslové pokusy. Na mediu G A T

jsou tyto poměry pro *Pseudomonas „cythro“* reprodukovatelné a proto v tomto směru jsou také nejslibnější možnosti pro další práci na tomto problému. Pod jménem bifázové selekce jsme metodu makrokolonií spojili s metodou fázové selekce, kterou jsme již použili pro průmyslové pokusy a vtělili i do patentových přihlášek 109—55 a 110—55 (1) o biosynthese vitamínu C. Dále jsme v předložené práci konali řadu pozorování, která se vztahuje na růst těchto makrokolonií. Asi za 6—8 hodin po vpichu do tuhého média se tvoří skupina nejmenších kulatých kolonií a to kolem vpichu. Po dalších 8 až 10 hodinách lze pozorovat věnc malých kolonií v podobě „atolu“, tam, kde se později tvoří zona „vicin“.

Později tento růženec utvořil kompaktní vrstvu (proužek), který nazýváme *prae-vicinem*. Tento „*prae-vicin*“ odškrucuje na obě strany kolonie, to jest centripetálně a centrifugálně další vrstvy-zony, takže po 24 hodinách vidíme makrokolonií, jak jsme ji v této práci popsali a jak přiložené fotografie a kresby dosvědčují.

Účelem této práce bylo podat přehled našich pozorování. Pracovním hypotézám přikládáme zatím orientační cenu.

I.

EINLEITUNG.

Vermittels Einstichs in ein geeignetes, starres Medium sogenannte Riesenkolonien zu züchten, ist nicht neu. Schönfeld, Brefeld, Delbrück (1) und eine Reihe anderer, älterer Forscher benutzten bereits diese Methode im Bereiche der Hefepilze. Als einer der ersten hat wohl A. Osterwalder (2) Heferiesenkolonienzüchtung als Methode der Reinzucht beschrieben; während Paul Regensburger (3) im Centralblatt f. Bakteriologie des Jahres 1906 drei obergährige Hefenarten auf Grund des Baues ihrer Riesenkolonien mitdifferenziert hat.

Früh schon haben sich aber auch Forscher gefunden, wie Beijerinck (4) und Hutchinson (5) und neben ihnen weniger Bedeutende, die auch die Bakterienriesenkolonie als Differenzialdiagnostikum heranziehen wollten.

Trotz teilweise kritischer Einstellung baut Hutchinson (5) auf der in der damaligen Zeit etwas phantastisch anmutenden Arbeit eines Polen, St. Serkovski (6) auf, der sich zur Unterscheidung der strukturellen Details im Bau der Kolonien ein ganze Reihe neuer Begriffe gebildet hat.

Auch Hutchinson, der übrigens das System Serkovskis trotz aller Kritik wörtlich abdruckt, versucht Ordnung in das System der Architekturen dieser Makrokolonien zu bringen und bedient sich dabei der Arbeiten von mehr als 20 Gewährsleuten, die wir durchstudiert, aber nur teilweise erwähnenswert gefunden haben. Weder Serkovski aber, noch Hutchinson versuchten, die offenbaren morphologischen Unterschiede zwischen den einzelnen Kolonieteilen metabolistischen Testen zu unterwerfen, wie wir es in der vorliegenden Arbeit getan haben. Wir sind bei dieser Überprüfung der Verhältnisse zwischen Morphologie und Metabolismus doch zur Erkenntnis einiger Gesetzmäßigkeiten gekommen,

die wir durch unsere Arbeit wenigstens in groben Rissen bewiesen zu haben glauben.

Die Anregung zu dieser Arbeit ging aber nicht von diesen älteren Arbeiten aus, sondern von einer einfachen Methode, auf Biermaischeagar 1:1 Riesenkolonien sporenbildender Bazillen zu diagnostischen und zu Reinigungszwecken zu züchten, die uns Prof. Mišustin, Mitglied der AN-SSR 1953 mitgeteilt hat.

Die vorliegende Arbeit bemüht sich in 13 Versuchen mit durchschnittlich 100 Beispielen der Struktur der Kolonien einiger Bakterienarten gerecht zu werden.

Regelmäßig wiederkehrende Koloniestrukturen sind schließlich nicht nur den erwähnten älteren Forschern wie Serkovski, Hutchinson, Regensburger oder Osterwalder aufgefallen, der bekannte bakteriologische Atlas von K. B. Lehmann und R. O. Neumann (12) der eine Art Vorläufer von Bergeys Bakteriensystem darstellt, verwendet bewußt und regelmäßig die Form der bakteriellen Kolonie als Differentialdiagnosticum.

Von den Zeiten Hutchinsons an bis heute könnte man verschiedene Perioden der Beurteilung von Koloniefragen unterscheiden. Die erste Periode reicht vom Zeitpunkt der Arbeit Hutchinsons (1907) (5) bis zu den Arbeiten P. Hadleys (1927) (14), der die Erscheinungen, welche in den Arbeiten von K. Baerthlein (1918) (13), Arkwright u. a. erstmalig beschrieben wurden, unter dem Namen der bakteriellen Dissoziation zu einer Art System vereinigt hatte. Neumanns und Lehmanns bakteriologische Diagnostik (12) trägt als Jahreszahl der Letztausgabe das Jahr 1920, geht aber in ihren Anfängen ins 19 Jahrhundert zurück, könnte also bis zu gewissem Grade als Ausdruck dieser ersten Periode aufgefaßt werden.

Die zweite Periode könnte man als Periode der bakteriellen Dissoziation bezeichnen und als ihr Ende das gehäufte Erscheinen von Arbeiten über die Bakterienveränderlichkeit bezeichnen, wie etwa die Gostëvs (15), Gamalejas (16) und Gračevas (17), Troickijs und anderer.

Die dritte Periode wäre dann erfüllt von Arbeiten, deren Aufgabe es zunächst sein muß, die positiven Werte der vorhergegangenen Arbeiten zu vereinen und durch richtige Wertung aufeinander abzustimmen.

Die erste Periode steht unter dem offenbaren Einfluß der beschreibenden („starren“) Systematik nach Koch-Cohn. Neumann und Lehmann geben eine ganze Reihe von Bakterien mit festumschriebenen Kolonieförmigkeiten an, die sich später oftmals als verschiedene Phasenformen der bakt. Dissoziation eines und desselben Mikroben erwiesen haben. Hutchinson (5) beschreibt ebenfalls nichts anderes, als feststehende Kolonieförmigkeiten und die Diskrepanz, die darin besteht, daß man zugleich regelmäßig wiederkehrende, charakteristische arteigene Formen annehmen kann und dabei bei der Ansicht bleiben möchte, daß es sich bei den Kolonien nur um ungegliederte Zooglooen handle, fällt nicht weiter auf und niemand kommt auf den Gedanken, aus den verschiedensten Teilen der Kolonien wenigstens Subkulturen anzulegen und diese metabolistisch zu testen, wenn schon die mikroskopische Technik offenbar versagte.

Die zweite Periode steht im Zeichen der Baerthlein-Arkwright-Hadleyschen Entdeckungen. Daß ein Mikrob sowohl serumdiagnostisch, als auch in bezug auf seine morphologischen und metabolischen Eigenschaften nun durch mindestens drei Phasenformen bestimmt werden soll: also mucous, smooth und rough, ja, möglicherweise noch mehr, wirft den alten Plan eines Bakteriensystems über den Haufen, das durch Formen und Eigenschaften der Einzelwesen bestimmt wurde. Solch ein System war nun zunächst technisch gar nicht zu beherrschen, da übermenschliche Kräfte dazu gehört hätten die Vielzahl der Phasenformen der bakt. Dissoziation in die Vielzahl der vorkommenden Arten einzureihen. In der Tat sind die Versuche, Kolonienformen differentialdiagnostisch zu verwenden mit dem Auftreten der Arbeiten über die bakt. Dissoziation verstummt.

Mit dem Auftreten jener Überfülle von guten und originellen Arbeiten über die Veränderlichkeit der Arten, weit über die Grenzen der bisherigen Erkenntnisse der bakt. Dissoziation hinaus, die vor allem von den Russen untersucht worden ist, ist die Unsicherheit gegenüber morphologischen Erkenntnissen in der Bakteriologie, besonders in bezug auf die Kolonienform noch gewachsen. Wir verweisen hinsichtlich dieser Arbeiten auf die ausgezeichnete Zusammenstellung I. M á l e k s über die Veränderlichkeit der Mikroorganismen in der Sovjetwissenschaft (18) und behandeln ein Prototyp dieser Arbeiten: Eine der prägnantesten Arbeiten über Artveränderung ist die Arbeit Gračeva (16), die unter der Leitung Gamalejas (17) Coli-bakterien auf einem Substrat passagierte, das getötete *Salmonella typhi murium* enthielt und nach einer Reihe von Passagen Mikroben mit typischen Eigenschaften dieser *Salmonella*-art nachweisen konnte.

Es ist klar, daß durch diese gescheidten und exakt ersonnenen Experimente die letzten Reste einer alten, unbeweglichen Systematik beseitigt erschienen. Wenn man aber angenommen hätte, daß nun alle und jede Form im Mikrobenleben veränderlich sei, hätte man übers Ziel geschossen. Die Arbeiten von Gračeva (16) und Gamaleja (17) haben eindeutig gezeigt und mit ihnen außerordentlich viele andere, daß es möglich ist, Bedingungen aufzufinden, unter denen eine Art abändern kann; daraus geht aber hervor, daß es andererseits Bedingungen gibt, auf die Mikroben stets gleichartig reagieren.

Wenn es uns im Laufe einer anderen Arbeit über Symbiosen (19) gelungen ist, aus angefaulten Äpfeln 16 verschiedene Symbiosen zu gewinnen und diese auf Biermaische-Schrägagarröhrchen lufttrocken über ein Jahr aufzubewahren, um bei erneuter Passagierung die gleichen Resultate wie am Anfang zu erhalten, so ist das ein Zeichen dafür, daß wir selbst bei solch labilen Kulturen, wie es Symbiosen sind, nichts von einer arbeitsstörenden Veränderlichkeit zu fürchten haben, wenn wir den Bedingungen einer Veränderungsmöglichkeit ausweichen.

Es haben sich auch schon in der zweiten Periode Forscher damit abgegeben, die Erscheinungen der bakt. Dissoziation als Charakteristika auszuwerten. Es war vor allem R. J. Dubos in seiner Synopsis „The Bacterial Cell“ (22), der so etwas schüchtern versuchte. Und Dubos war es auch, der uns Material für das Zusammentreffen der Erscheinungen

zweier verschiedener Dissoziationsphasen in einer und derselben Kolonie lieferte (Bakterienkoloniesektoren). Biochemisch bearbeitete Gostěv (15) diese Fragen vorbildlich und so fanden wir für eine eigene Arbeit, die der Vorläufer der vorgelegten genannt werden kann, in dieser 2. Periode bei den genannten Autoren bereits Ansätze; es handelt sich um die Arbeit „Zlepšeni kvasné výroby Ca-d-2-ketoglukonanu využitím bakteriální disociace⁵⁾, (20).

Damals ging es uns darum, zu untersuchen, in wieweit ein Mikrob (in diesem Falle *Ps. „cythro“*) unter verm. gleichartigen Bedingungen sich bakt. dissoziativ ändert und dadurch Bedingungen für seine Aktivierung liefert, die von Zeit, Mediumzusammensetzung, Inokulum-menge und -art usf., also von einstellbaren Bedingungen abhängt. Es gelang uns empirisch ein optimales Alter der dissoziativ besten Kolonie zu finden und durch diese Phasenselektion einen höchst aktiven Industriestamm zu erzielen⁵⁾, (20).

Die Methode Prof. Mišustins sollte uns, wie wir meinten, zunächst helfen, die für die genannte Arbeit notwendigen weiteren wissenschaftlichen Voraussetzungen zu liefern.

Sie führte uns weiter, da schon der Vergleich von Einstichkolonien auf Biermaische-agar, Bouillon-agar und ihrer Mischung reproduzierbare Phasenformen S, R und ihren Übergang ergaben. Da weiterhin bei sporenbildenden Bazillen, bei Chromobakterien, Pseudomonaden und Essigbakterien eine konzentrische Zonenbildung auf allen verwendeten Böden zu beobachten war, Fig. 1: faßten wir den Plan, vor allem die oxydoreduktiven Bakterien, die uns besonders interessierten, also Pseudomonasarten (und unter ihnen vor allem *Pseudomonas „cythro“*) und Essigbakterien (unter ihnen vor allem *Acetobacter suboxydans*) zu untersuchen.

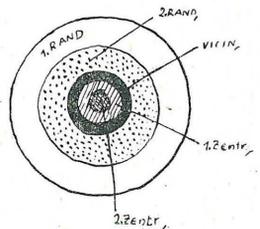


Fig. 1.

Der Plan unserer Versuche führt von der äußersten Breite (Versuch I—IV) zur Verwendung lediglich von *Pseudomonas*- und *Acetobacter*arten (Versuch V—VI) und schließlich entsprechend den Erkenntnissen der ersten 6 Versuche zur Beschränkung auf eine Art: die uns am besten bekannte *Pseudomonas „cythro“*.

Das war unser Versuchsplan in bezug auf die untersuchten Mikrobenarten. Auch in bezug auf Böden und Bodenmischungen sind wir von der breitesten Basis ausgegangen und haben, wie aus der Methodik (II) hervorgeht, vor allem Glukose, Glukonat, Biermaische (Maltose) und Bouillon in den verschiedensten Zusammensetzungen erprobt und dann diese Böden einmal im Verhältnis 1:4, dann wieder im Verhältnis 1:1 gemischt.

Wie erhielten ein unübersehbar reiches Material, aus dem drei Grundkenntnisse resultierten:

1. daß die Charakteristik eines Stammes, auch auf den verschiedensten Böden trotz aller Veränderungen klar erkennbar wieder auftritt, daß also die durch die bakt. Dissoziation bedingten, wie auch andere Abänderungen und Begleitumstände nicht so groß sein können, daß das Prinzip

der Entwicklung einer solchen Bakterienkolonie nicht erkannt werden könne.

2. Daß aber die morphologischen und insbesondere die metabolischen Ergebnisse so schwanken, daß weder ein Überblick, noch auch eine praktische Wertung möglich war. Wir haben die metabolistischen Ergebnisse stets auf die Bildung von Ca-2-keto-D-glukonat aus Ca-D-glukonat nach 72 Stunden auf der Bodenzusammensetzung MEL II (Tafel!) unter gleichen Bedingungen geprüft.

3. Es ist uns aber doch gelungen aus all den für *Ps. „cythro“* verwendeten Bodenzusammensetzungen jene eine zu finden, die wir schon aus der Praxis der Züchtung dieses Mikroben als optimal kannten, nämlich reichen, halbsynthetischen Glukonatboden GAT (Tafel III A), auf dem die Bildung der Makrokolonien regelmäßig und reproduzierbar ein Ergebnis lieferte, das in Kombination mit der Phasenselektion eine ganz besondere Aktivierungsmethode lieferte, die Biphasenselektion, die wir darum nach praktischer Erprobung unter 109—55 und 110—55 in unsere Patente der Biosynthese des Vitamins C eingereiht haben.¹⁾

Den Ergebnissen dieser Arbeit billigen wir Orientierungswert zu, weil wir uns dessen bewußt sind, daß die Erforschung des Verhaltens von *Ps. „cythro“* auf GAT Tafel III A unter den behandelten Bedingungen auch auf andere Bodenzusammensetzungen, resp. Bedingungen dieses Mikroben ausgedehnt werden muß und daß dieser Weg dann auch für andere Pseudomonasarten gegangen werden muß und schließlich auch für andere Mikroben (wie uns das weniger gelungene Beispiel des *Suboxydansteiles* dieser Arbeit zeigte).

Mit anderen Worten: Wir müssen für jeden Mikroben, den wir untersuchen a) die Bedingungen kennen, die seine dissoziativen Phasenformen hervorrufen, b) die Bedingungen, unter denen er abändert oder (wenigstens scheinbar) stabilisiert erscheint und c) die optimalen Bedingungen physiologischer resp. metabolistischer Natur, die uns gestatten, die unter a) und b) gesammelten Erfahrungen anzuwenden. Von dem Falle, den wir in unserer Arbeit als Endergebnis gefunden haben, müssen wir künftig ausgehen. Daß wir ihn für *„cythro“* auf GAT gefunden haben und ausarbeiten konnten, das stellt den Hauptwert unserer Arbeit für kommende Untersuchungen dar.

Sodann haben wir auch Kombinationsversuche unternommen. Es lockte, die Zonenselektion mit der Phasenselektion zu verbinden. Schließlich lag es auch nahe, aus den einzelnen Zonen Bakterienmasse zu neuen Kolonie-einstichen zu verwenden und das Ergebnis abzuschätzen und zu studieren. Es erwachsen aus diesen Einstichen erneut Kolonien mit der gleichen Zonengliederung, woraus ersichtlich ist, daß diese Zonierung der Ausdruck eines physiologischen, nicht aber eines genetischen Geschehens ist, aber wir stellten fest, daß die so passagierten Makrozonensämme raschere und bessere Ergebnisse in bezug auf ihren Metabolismus lieferten. Dies ist umso wichtiger, als das Hauptargument für die *„cythro“*-GAT-verhältnisse, das wir in der wiederholten Reproduktion, also in der Reproduzierbarkeit finden, hier eine Unterstützung erlangt. Die aus der aktivsten Zone einer Makrokolonie passagierte Makrokolonie liefert in

allen ihren Zonen bessere Ergebnisse, als die Makrokolonie eines unbehandelten Stammes und das optimale Ergebnis unter ihren Zonen liefert wiederum die von uns im experimentellen Teil beschriebene charakteristische, aktivste Zone.

Begleitende Beobachtungen über Entwicklung und Wuchs einer Makrokolonie wurden anhangsweise zusammengestellt.

An dieser Stelle ist es uns eine angenehme Pflicht, unserem Vorgesetzten, Akademiemitglied und Vorstand der biologischen Sektion der ČSAV, Prof. Ivan Málek, Dr. der mediz. Wissenschaften, für seine aufopfernde Hilfe, für Ratschläge und für sein großes Vertrauen im Laufe dieser Arbeit herzlich zu danken;

sodann möchten wir nicht verfehlen, Prof. Mišustin, Mitglied der AN-SSSR für seine Anregungen und nicht zuletzt den Mitarbeitern der Abteilung Mikrobensammlungen des Biologischen Instituts zu danken.

II.

METHODIK.

Unsere Methodik ging bei den im Folgenden beschriebenen 13 Versuchen von der Anregung Prof. Mišustins aus: Makrokolonien sporenbildender Bazillen auf Biermaische-agar 1:1 zu züchten.

Die ersten vier Versuche dienten der Orientierung und stehen auf breiter Grundlage sowohl in bezug auf Bodenzusammensetzungen, als auch verwendete Mikroben.

DIE NÄHRBÖDEN:

Da es uns darauf ankam, möglichst bald zu den Verhältnissen der oxydoreduktiven, industriellen Stämme zu gelangen, verglichen wir die Ergebnisse auf Biermaische-agar mit denen auf Bouillon-agar, auf Glukoseboden-agar — NKT-alfa und Glukonatboden-agar — GAT-alfa.

Mischungen im Verhältnis 1:4 und 4:1 setzten wir an, um ausgehend von gewissen Industrienerfahrungen festzustellen, wie weit ein 20%iger Bodenzusatz schädigt oder fördert und wie genau man dies aus einer Makrokolonie ablesen kann. Dabei gingen wir noch immer von der Vorstellung aus, in der Makrokolonie eine Art Vergößerung der Mikroverhältnisse zu sehen, was nur teilweise stimmt.

Die technisch beschwerliche Gliederung der Versuche in 12 resp. 19 verschiedene Böden und Bodenmischungen 1:4 und 4:1 verließen wir bald zugunsten einfacherer Mischungen 1:1.

Interessant, aber weitaus nicht erschöpft waren alle unsere Versuche (ab Versuch Nr. V), in denen neben den sogenannten, angereicherten Bodenzusammensetzungen (GAT und NKT) vor allem auch die Hungerbodenformen GAC und NKH) verwendet wurden (siehe Tafel III A).

Tief eingreifend in den Vorgang unserer Methodik war das Auftreten der unter IV ausführlich behandelten morphologisch und metabol. verschiedenen Zonen der Makrokolonien.

Nachdem eine bei Versuch III bis V und weiterhin sehr sorgfältig

durchgeführte mikroskopische Kontrolle ergeben hatte, daß (entgegen den Ergebnissen der Kolle, Hetsch, Wassermann und Hutchinson) (5) die Individuen einer solchen Zone zwar untereinander homogen erschienen, aber von den benachbarten Zonen stark verschieden, wurde es notwendig, in der weiteren Arbeit Abstriche aus diesen Zonen nicht nur mikroskopisch, sondern auch metabolistisch zu testen.

Wir impften anfangs mit freiem Auge, später unter der Stativlupe (da seltene Irrtümer immerhin vorkamen) Bakterienmasse aus den einzelnen Zonen der Makrokolonien ab und impften mit ihr jeweils 25 ml der Bodenzusammensetzung MEL II (ist gleich C A C) (14) unter stets gleichen Bedingungen. Diese Isolokulturen inkubierten wir 72 Stunden. Das Ergebnis wurde in diesen fest definierten Böden mittels Proben nach Fehling-Bertrand getestet und in % Ca-2-keto-D-glukonat (aus Ca-D-glukonat) angegeben.

In Versuch IV—V verwendeten wir 72 Stunden alte Makrokolonien zum Abimpfen in Subkulturen, ab Versuch VI 46 Stunden alte Kolonien.

Dieser verhm. einfache Vorgang stellt eine wesentliche Neuerung in unserer Arbeit gegenüber den bisherigen Arbeiten über Koloniestrukturen dar.

Wir versuchten auch den feuchten Einstich, der eine sicherlich genug schwankende Populationsmenge einzelner „cythro“-Zellen darstellt durch große Tropfen (Versuch XI) zu ersetzen, die sich aber verschmierten. Mit Mikropipetten applizierte mengen- und populationsmäßig genau definierte, kleine Tröpfchen haben sich bewährt (Versuch XII, XIII). Sog. trockene Einstiche (mit dem Drätchen aufgenommene Bakterienmasse) aus Makrozonon verwendeten wir beim Passagieren der Makrozononstämme.

Es folgt nun eine Übersichtstabelle aller verwendeten Bodenarten (III A) und aller Versuche in bezug auf Bodenzusammensetzung, verwendete Mikroben und Ergebnisse, zu denen auch die Tabellen über die Metabolismusteste gehören, als Grundlage des Verständnisses des experimentellen Teils (IV).

III A

Tabelle der Bodenzusammensetzungen:

1. Bouillon:

lege artis hergestellter Fleischsaft ad 10000 ml,
5 % Pepton,
5 % NaCl.

2. Biermaische, ungehopft.

8° Balling enthält 5 % Maltose.

3. NKT (halbsynthetischer Glukoseboden): normal.

50 g D-Glukose,
125 ml 20% Hefeautolysat (entspr. 2,5% Frischhefe),
15 g CaCO₃,
ad 1000 ml Leitungswasser.

4. NKH (synthetischer Glukoseboden): Hungerboden.

50 g D-Glukose,
5 g Ca-D-Glukonat (Reizmittel),

25 ml 20% Hefeautolysat (entspr. 0,5% Frischhefe),
15 g Kreide (CaCO₃),
2g (NH₄)₂ HPO₄,
1 g KH₂PO₄,
250 mg MgSO₄ · 7H₂O,
ad 1000 ml Leitungswasser.

5. GAT (Halbsynthetischer Glukonatboden) normal

50 g Ca-D-glukonat,
125 ml 20% Hefeautolysat (entspr. 2,5% Frischhefe),
ad 1000 ml Leitungswasser.

6. GAC (Synthetischer Glukonatboden) aktiver Hungerboden,¹⁴⁾
oder MEL. II

50 g Ca-D-Glukonat,
5 g D-Glukose (Reizmittel),
25 ml 20% Hefeautolysat (entspr. 2,5% Frischhefe),
2 g (NH₄)₂ HPO₄
1 g KH₂PO₄,
250 mg MgSO₄ · 7H₂O,
ad 1000 ml Leitungswasser.

MEL I:

50 g Ca-D-Glukonat,
5 g D-Glukose (Reizmittel),
125 ml 20% Hefeautolysat (entspr. 2,5% Frischhefe),
ad 1000 ml Leitungswasser.

III. B.

Tabelle der Versuche:

Bei jedem Versuche folgen Abschnitt 1. Verwendete Bodenarten, Abschnitt 2. Mikroben und Abschnitt 3. Ergebnisse.

Versuch Nr. 1. 15. 3. 1954

Versuch Nr. 2. 27. 3. 1954

Versuch Nr. 3. 5. 4. 1954

Verwendete Bodenarten:

1. Bouillonagar: 5% Trockenagar, Flüssigkeit: Fleischsaft normal, 5% Pepton, 5% NaCl.
2. Biermaische-agar: 5% Trockenagar, Flüss.: Biermaische 8^o Balling (5% Maltose).
3. Mischungsagar: 5% Trockenagar, Flüss.: Bouillon, Biermaische Mischung 1:1.
4. GAT-agar: 5% Trockenagar, Flüss.: GAT-Boden laut Tafel III A (5% Glknat).

Verwendete Mikroben:

1. Sporenbildner: *B. mesentericus* ATCC, *B. subtilis* NCTC, *B. cereus* var. *mycoides*.
2. Chromobakterien: *Chr. prodigiosum* ATCC, *Chr. jodinum*. *Chr. violaceum*. *violaceum*.
3. Pseudomonaden: *Pseudomonas „cychro“* Mglbl, *Ps. „cychro“* Mgl 2 II., *Ps. aeruginosa* ATCC, *Pseudomonas putida* ATCC.

Ergebnisse:

Auf Bouillon, Biermaische, sowie deren Mischungsagar zeigen die untersuchten Mikroben verschiedenartig gestaltete, konzentrische Zonen.

Auf Bouillon zeigen sich Charakteristika-rough: zerklüfteter Rand, rauh bis körnige Oberfläche (matt) Überimpfung zusammenhängender Partien.

Auf Biermaische Charakteristika-smooth: Glatter Rand, glatte Oberfläche, gutes Abimpfen salbenförmiger Bakterienmasse.

Auf Mischungsagar Resultante, Eigenschaften liegen in der Mitte zwischen rough und smooth.

Makrokolonien nach 24 Std. messen 20×30 bis 30×50 mm. „*cythro*“-kolonien sind klein (5×10 mm) und erst nach 4 Passagen grösser.

Versuch Nr. 4. (8. 4. bis 30. 4. 1954)

Verwendete Bodenarten:

1. Boden I.: 3% Trockenagar, Flüss.: Biermaische 8^o Bllg, ungemischt (5% Maltose).
2. Boden IV.: 3% Trockenagar, Flüss.: GAT ungemischt (5% Glknat.).
3. Boden IV.: 3% Trockenagar, Flüss.: NKT ungemischt (5% Glukose).
4. Boden VI.: 3% Trockenagar, Flüss.: 80% Biermaische, 20% Bouillon (4% Maltose) 4:1.
5. Boden VII.: 3% Trockenagar, 80% NKT, 20% Bouillon (4% Glukose) 4:1.
6. Boden VIII (—XVI): 3% Trockenagar, Flüss.: 80% NKT, 20% Biermaische, 4% Gluk, 1% Malt.
7. Boden XI.: 3% Trockenagar, 80% GAT, 20% Biermaische, (4% Glknat, 1% Maltose) 4:1.
8. Boden XII.: 3% Trockenagar, Flüss.: 80% GAT, 20% NKT (4% Glknat, 1% Glukose) 4:1.
9. Boden XV.: 3% Trockenagar, Flüss.: 80% Bouillon, 20% NKT (1% Glukose) 4:1.
10. Boden XVIII.: 3% Trockenagar, Flüss.: 80% Biermaische, 20% GAT (4% Malt, 1% Glknat.).
11. Boden XVIII.: 3% Trockenagar, Flüss.: 80% Bouillon, 20% Biermaischen (1% Maltose) 4:1.
12. Boden XIX.: 3% Trockenagar, Flüss.: 80% Bouillon, 20% GAT (1% Glknat) 4:1.
13. Boden für Isokulturen: MEL II. (GAC) 50 g Glknat, 5 g Glkose, 25 ml 20% Hefeautolysat, Nährsalze (siehe Tafel III. A.).

Verwendete Mikroben:

1. Oxydoreduktive Stämme:
Acetobacter suboxydans ATCC 621,
Acetobacter suboxydans NCTC,
Acetobacter suboxydans Baarn,
Acetobacter suboxydans Neratovice,
Acetobacter nova spec. („Famel“),
Pseudomonas „cythro“ drei Stämme,
 2. Chromobakterien:
Chromob. prodigiosum ATCC,
Chromob. jodinum ATCC,
 3. Sporenbildner:
B. mesentericus ATCC,
B. subtilis NCTC,
B. cereus var. mycoides,
B. agrestis T.
- im Ganzen 14 Stämme.

Ergebnisse:

Die Riesenkolonien zeigen nach 24 Stunden drei voneinander makroskopisch und mikroskopisch verschiedene Zonen:

Es sind dies von außen nach innen Rand, „Vicin“ und Zentrum. Nach 48 bis 72 Stunden vermehren sich die Zonen auf 4, 5 und mehr. Native und Grampräparate der Individuen dieser Zone haben ergeben, daß diese Zonen fast durchweg voneinander verschieden sind.

Eine Übereinstimmung der entsprechenden Zonen auf den verschiedenen Böden ergab sich auf VI 1, V/2, und VI 2, auf VII 1, 2, 3, XII 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, IX 1, 2, 3, 6. XVIII 1, 2, 3, XIX 1, 2, 3 XV 1, 2, 3, 5.

Die Zonenbildung ist vom Medium abhängig, soweit es sich um die Morphologie der Individuen und um den Metabolismus der Subkulturen handelt.

Klar reproduzierbare Verhältnisse auf GAT für *Ps. „cychro“*. Auf diesem Boden sind die Erscheinungen für den Mikroben optimal:

Der Rand weist grössere Individuen bei schwächsten Subkulturen auf.

Der „Vicin“ kleinste kokkoide Individuen bei aktivsten Subk.

Das Zentrum liegt in der Mitte.

Alle anderen Ergebnisse schwanken. Auch Böden mit 80 % GAT sind für *Ps. „cychro“* noch gut, 20 % GAT fördert, aber reicht zur Vollentwicklung der Eigenschaften von „cychro“ nicht mehr aus. Glukoseboden ist für „cychro“ ungünstig, Biermaische hemmt diesen Mikroorganismus noch mehr.

Für *A. suboxydans* ist der Boden NKT optimal. Doch sind die Verhältnisse auch für diesen Organismus auf diesem Boden nicht so klar, wie für „cychro“ auf GAT. Glknt ist für *A. suboxydans* nur wenig schlechter, als Glukose. Biermaische verlangsamt, Bouillon hemmt seinen Metabolismus.

Versuch Nr. 5 (Mai 1954)

Verwendete Bodenarten:

Bei diesem Versuche werden die gleichen Böden in der gleichen Reihenfolge verwendet, wie bei Versuch IV. Nr. 1—13.

Verwendete Mikroben:

1. Nur noch oxydoreduktive Stämme *Pseudomonas*- und *Acetobacter*-arten)

Pseudomonas „cychro“ GIV

Pseudomonas „cychro“ B 12 (alt)

Pseudomonas „cychro“ D 12 (aus Konserve).

Acetobacter suboxydans 95/1. ATCC 621

Acetobacter suboxydans 95/7 BHO - 1. 8. (5-Ketostamm).

Acetobacter suboxydans NCTC (brit.) (2+5-Ketostamm).

Acetobacter suboxydans Baarn 15. III. (54 2-Ketostamm).

Ergebnisse:

Es wurden 72 Stunden alte Makrokolonien verwendet.

Die aus den Zonen Rand, „Vicin“ und Zentrum abgeimpften Isolokulturen zeigten nach 72 Stunden Gärzeit gemäß der Analysen nach Fehling-Bertrand stärkste Gegensätze:

	Stamm:	Platt:	Mischg:	Rand:	Vicin:	Zentr:	Zentr:	Bemerkg:	Alter Ver- such: Zone:
<i>Ps. „cychro“</i>	G 4	NKT	ungem.	12,5	—	13,42	—	Prozente	V. 72 St.
<i>Ps. „cychro“</i>	B 12	NKT	ungem.	22,8	—	?	—	Fehling	V. 72 St.
<i>Ps. „cychro“</i>	D 12	NKT	ungem.	28,2	32,5	35,6	—	2-Ketoglk	V. 72 St.
<i>Ps. „cychro“</i>	G 4	GAT	ungem.	57,5	97,5	40,6	—	aus Glknt.	V. 72 St.
<i>Ps. „cychro“</i>	B 12	GAT	ungem.	—	77,5	66,25	61,25	(Abkürzgen	V. 72 St.
<i>Ps. „cychro“</i>	D 12	GAT	ungem.	50,0	96,5	79,0	8,13	siehe IV.)	V. 72 St.
<i>Ps. „cychro“</i>	G 4	GT : Bierm	4 : 1	20,6	20,0	21,1	53,0		V. 72 St.
<i>Ps. „cychro“</i>	B 12	GT : Bierm	4 : 1	18,9	33,4	—	—		V. 72 St.
<i>Ps. „cychro“</i>	D 12	GT : Bierm	4 : 1	33,4	24,1	40,0	?		V. 72 St.
<i>Ps. „cychro“</i>	G 4	BU : NKT	4 : 1	29,4	5,4	23,3	13,6		V. 72 St.
<i>Ps. „cychro“</i>	B 12	BU : NKT	4 : 1	85,0	61,3	55,6	7,3		V. 72 St.
<i>Ps. „cychro“</i>	D 12	BU : NKT	4 : 1	70,6	4,05	23,3	28,2		V. 72 St.
<i>Ps. „cychro“</i>	G 4	NK : GT	4 : 1	46,5	52,0	20,6	—		V. 72 St.
<i>Ps. „cychro“</i>	B 12	NK : GT	4 : 1	84,3	64,7	53,6	7,3		V. 72 St.
<i>Ps. „cychro“</i>	D 12	NK : GT	4 : 1	40,6	48,3	74,2	?		V. 72 St.
<i>Ps. „cychro“</i>	G 4	NK : Bierm	4 : 1	14,7	21,7	19,4	—		V. 72 St.
<i>Ps. „cychro“</i>	B 12	NK : Bierm	4 : 1	11,6	39,6	14,7	32,8		V. 72 St.
<i>Ps. „cychro“</i>	D 12	NK : Bierm	4 : 1	24,7	27,7	18,3	—		V. 72 St.

Aus dieser Tabelle ergeben sich für Ps. „*cychro*“ nur auf GAT folgende reproduzierbare Verhältnisse:

	Rand: 57,5	50,0	—	im Durchschnitt: 54,0 %
	„Vicin“: 97,5	77,5	96,5	im Durchschnitt: 90,5 %
1. Zentrum:	40,6	66,25	79,0	im Durchschnitt: 61,95 %
2. Zentrum:	—	61,25	8,13	im Durchschnitt: 34,69 %

A. *suboxydans*:

Für A. *suboxydans* sind diese Verhältnisse keineswegs so klar. Die Schwierigkeit der einzelnen Abimpfungen wird auch durch das Fehlen vieler Zahlen der Tabelle deutlich, da die Makrokolonien nicht entwickelt und alt genug waren, um entspr. fassbare Zonenstellen zu liefern. Auf Grund der folgenden Tabelle wurde A. *suboxydans* für die weitere Arbeit ausgeschaltet und für eine spätere vorgesehen.

Stamm:	Platt:	Mischg:	Rand:	Vicin:	Zentr:	2. Zentr:	Bemerkg:	Alter d. Versuch: Zone
f. A. <i>subox.</i>	ATCC	NKT	ungem.	5,0	9,36	6,25	—	V. 72 St.
f. A. <i>subox.</i>	95/7	NKT	ungem.	5,6	3,13	1,25	—	V. 72 St.
f. A. <i>subox.</i>	Baarn	NKT	ungem.	—	—	5,0	—	V. 72 St.
f. A. <i>subox.</i>	ATCC	GAT	ungem.	5,6	—	10,0	—	V. 72 St.
f. A. <i>subox.</i>	95/7	GAT	ungem.	1,3	—	14,8	—	V. 72 St.
f. A. <i>subox.</i>	Baarn	GAT	ungem.	—	10,7	10,7	—	V. 72 St.
f. A. <i>subox.</i>	ATCC	GT : Bierm	4 : 1	17,9	12,3	19,4	—	V. 72 St.
f. A. <i>subox.</i>	95/7	GT : Bierm	4 : 1	10,8	11,6	2,4	—	V. 72 St.
f. A. <i>subox.</i>	Baarn	GT : Bierm	4 : 1	?	—	10,8	—	V. 72 St.
f. A. <i>subox.</i>	ATCC	BU : NKT	4 : 1	11,3	—	8,7	—	V. 72 St.
f. A. <i>subox.</i>	95/7	BU : NKT	4 : 1	9,3	—	18,5	—	V. 72 St.
f. A. <i>subox.</i>	Baarn	BU : NKT	4 : 1	—	—	15,6	—	V. 72 St.
f. A. <i>subox.</i>	ATCC	NK : GT	4 : 1	6,4	—	17,2	—	V. 72 St.
f. A. <i>subox.</i>	95/7	NK : GT	4 : 1	—	—	25,9	—	V. 72 St.
f. A. <i>subox.</i>	Baarn	NK : GT	4 : 1	—	—	—	—	V. 72 St.
f. A. <i>subox.</i>	ATCC	NK : Bier	4 : 1	5,4	—	—	—	V. 72 St.
f. A. <i>subox.</i>	95/7	maische	4 : 1	5,4	—	—	—	V. 72 St.
f. A. <i>subox.</i>	Baarn	maische	4 : 1	—	—	—	—	V. 72 St.

Versuch Nr. 6 (18. bis 28. 6. 54)

Verwendete Bodenarten:

1. Boden I.: 3% Trockenagar, Flüssigkeit: GAT ungemischt. (5% Glknat).
2. Boden II.: 3% Trockenagar, Flüss.: NKH ungemischt (5% Gkose, 0,5% Glknat).
3. Boden III.: 3% Trockenagar, Flüss.: NKH : GAT (1 : 1) 2,5% Gkose, 3% Glknat.
4. Boden IV.: 3% Trockenagar, Flüss.: NKH : GAC (1 : 1) 3% Gkose, 3% Glknat.
5. Boden V.: 3% Trockenagar, Flüss.: NKT ungemischt 5% Gkose.
6. Boden VI.: 3% Trockenagar, Flüss.: NKT : GAT (1 : 1) 2,5% Gkose, 2,5% Glknat.
7. Boden VII.: 3% Trockenagar, Flüss.: NKT : GAC (1 : 1) 3% Gkose, 2,5% Glknat.
8. MEL - I: 3% Trockenagar, Flüss.: MEL - I. 5% Glknat.
9. Boden IX.: 3% Trockenagar, Flüss.: GAC ungemischt 5% Glknat, 0,5% Gkose.
10. Boden X.: 3% Trockenagar, Flüss.: Bouillon ungemischt.
11. Boden XI.: 3% Trockenagar, Flüss.: Bouill : NKT (1 : 1) 2,5% Gkose.
12. Boden XII.: 3% Trockenagar, Flüss.: Bouill : NKH (1 : 1) 2,5% Gkose, 0,5% Glknat.
13. Boden f. Isokulturen: MEL - II. (Tabelle III. A.)

• Verwendete Mikrobenarten:

Ausschließlich „*cychro*“-Stämme:

Pseudomonas „*cychro*“ PQ 8/2 (Phasenkolonie!)

Pseudomonas „*cychro*“ PQ 8/4

Pseudomonas „*cychro*“ PQ 8++

Pseudomonas „*cychro*“ PQ I (Kontrollstamm aus Konserve).

Ergebnisse:

46 Stunden alte Makrokolonien wurden zur Abimpfung von Isokulturen verwendet. Diese zeigten darum weniger augenfällige Unterschiede zwischen den Ergebnissen aus den Makrozonen, ergeben aber nach Passagierung Inokula von dauerhafterer Aktivität.

Auszug aus den Tabellen der Fehlungsproben zu Versuch Nr. 6:

Bakt:	Stamm:	Urboden:	1. Rand:	2. Rand:	Vicin:	Zentrum:	Alter d. Kolonie:
„Cychr“	PQ 8 I	G A T	11,0	—	12,0	10,0	46 St.
„Cychr“	PQ 82/1	G A T	10,0	9,0	15,5	15,0	46 St.
„Cychr“	PQ 8++	G A T	10,0	12,0	16,5	15,25	46 St.
„Cychr“	PQ 8/4	G A T	10,0	13,0	25,0	10,0	46 St.
Durchschnitt			10,2	11,3	17,2	12,56	46 St.

Versuch Nr. 7 (11. 18. 8. 1954)

Verwendete Bodenzusammensetzungen:

Es wurden die gleichen Bodenzusammensetzungen wie in Versuch Nr. 6. verwendet

Verwendete Mikrobenstämmе:

In Versuch Nr. 7 und von da an werden nur noch vorbehandelte Stämme verwendet.

Makrozonenstamm *Ps. „cythro“* PQ 8₂₅ ex Zentrumzone aus V).

Makrozonenstamm *Ps. „cythro“* PQ 8-AV (ex „Vicin“ v. Versuch V).

(Außerdem wurden auch phasenselektierte Stämme verwendet).

Ergebnisse:

In Versuch Nr. 7 wurden Isokulturen aus 46 Stunden alten Makrokolonien angelegt. Aus Makrozonenstämmen bilden sich wiederum neue drei- und mehrzonige Kolonien. Der Zuwachs beträgt je 24 Stunden durchschnittlich einen mm.

Die Ergebnisse aus Makrozonen-Stämmen sind viel höher als aus unbehandelten.

Eine Übersichtstabelle über Makrozonenzuwachs (mm je 24 Stunden) und Fehlungsproben einer 72 Stunden alten Subkultur ergeben in % Ca-2-keto-D-glukonat in 72 Stunden:

Bakt:	Stamm:	Urspr:	Zuwachs			Fehlungsproben aus Subkult.	
			24 St.: in mm	48 St.: je Durchschnitt	72 St.: Durchschnitt	24 St. alt. Makroz.	48 St.
PQ 8 ₂₅	1a	Zentr. V.	4,5	7,0	9,0	22 % zentr.	—
PQ 8 ₂₅	1b	Zentr. V.	4,0	8,0	9,0	—	—
PQ 8 ₂₅	1c	Zentr. V.	4,0	8,0	9,0	—	—
PQ 8 ₂₅	2a	Zentr. V.	5,0	6,0	9,0	22 % zentr.	36 % zentr.
PQ 8 ₂₅	2a	Zentr. V.	5,0	6,0	9,0	24 % „vicin“	38 % „vicin“
PQ 8 ₂₅	3a	Zentr. V.	?	6,0	8,0	—	—
PQ 8 ₂₅	3b	Zentr. V.	?	3,0	5,0	—	—
PQ 8-AV	A1a	„Vicin“ V.	5,0	8,0	10,0	24,5 % zentr.	35 % zentr.
PQ 8-AV	A1a	„Vicin“ V.	5,0	8,0	10,0	34,0 % „vicin“	46 % „vicin“
PQ 8-AV	A1b	„Vicin“ V.	6,0	9,0	10,0	—	—
PQ 8-AV	A2a	„Vicin“ V.	4,0	5,0	7,0	—	—
PQ 8-AV	A2b	„Vicin“ V.	—	4,0	7,0	—	—
PQ 1	Kontrollstamm (unbehandelt)		6,0	7,0	7,0	18 % zentr.	—
PQ 1	1b		6,0	8,0	8,0	18 % zentr.	25 % zentr.
PQ 1	2a		5,0	6,0	6,0	18 % zentr.	25 % zentr.
PQ 1	2b		5,0	7,0	8,0	19 % „vicin“	26 % „vicin“
PQ 1	3a		5,0	7,0	7,0	—	—
PQ 1	3b		6,0	7,0	7,0	—	—

Versuch Nr. 9 (7. 1. bis 22. 1. 1956)

Verwendete Bodenzusammensetzungen:

Böden, wie in Versuch 6, werden anstelle von 3% Trockenagar je eine Reihe mit 2,5% Trockenagar und eine mit 2% Trockenagar angesetzt und studiert.

Verwendete Mikrobenarten:

Makrozonstamm Pseudomonas „cychro“ I. 1 (ex „vicin“ von Versuch 6.)
Phasenselektionsstamm Ps. „cychro“ 2_g/I. 2.

Ergebnisse:

2,5% Trockenagar ergeben bessere und raschere Resultate als 3% oder 2%.

Versuch Nr. 10 (26. 1. bis 8. 2. 1956)

Verwendete Bodenarten:

Wie in Versuch Nr. 9, aber ausschließlich mit 2,5% Trockenagar.

Verwendete Mikroben:

Die gleichen Stämme, wie in Versuch Nr. 9.

Ergebnisse:

1. Wachstumsbeobachtung einer Makrokolonie vom Zeitpunkt des Einstichs an.

Beispiele: I. 1 - 24/24 Stunden,
I. 2/2_g48/24 Stunden.

Tafel der Ergebnisse des Glukonatmetabolismus der Stämme:

Bakt.:	Stamm:	24	24	24	R.	V.	Z.	48	48	48	R.	V.	Z.	72	71	72	Z
cchr.	I. 1.	7m	—	—	62	—	61	7,5	—	—	—	100	100	2m	—	—	18
cchr.		8m	—	—	—	88	72	—	8m	—	72	92	84	—	3m	—	—
cchr.			9m	—	76	100	84	—	—	9m	—	—	—	—	—	4m	—
cchr.	2 _g (I.2.)	—	—	—	—	—	—	8m	—	—	—	—	78	6m	—	—	—
cchr.		8m	—	—	—	72	—	—	10.1	—	—	—	100	—	—	—	—
cchr.			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Versuch 11. bis 15.

Verwendete Bodenarten:

wie Versuche 6, 7, 9, 10 (mit 2,5% Trockenagar).

Verwendete Mikroben:

wie in Versuch 10.

Technik:

Große Tropfen anstelle von Einstichen (Versuch 11).

Kleine mengen- und populationsmäßig genau definierte Tropfen mit Mikropipetten appliziert.

Trockene Einstiche (aus Bakterienmasse von Agarrasen).

Ergebnisse:

Die großen Tropfen bewähren sich nicht, weil sie sich verschmieren auf der Petri-schale. Die kleinen Mikrotropfen ergeben gute Ergebnisse. Die Trockeneinstiche wurden schon bei den Makrozonstämmen verwendet.

IV.

EXPERIMENTELLER TEIL

Wie aus der beigelegten Tabelle III B hervorgeht, haben wir 13 Versuche in breiten Reihen mit durchschnittlich 100 Beispielen oder Fällen durchgeführt. Dabei leitete uns der Plan, dem Verhältnis zwischen morphologischen und metabolistischen Eigenschaften der Kolonien näher zu kommen, wenn wir von Versuch I. und seinen beiden Wiederholungen II. und III. absehen, die reine Orientierungsversuche im Anschluss an die Anregungen Prof. Mišustins darstellten.

Unsere ursprüngliche Absicht bestand darin, die Mišustinschen Riesenkolonienzüchtungen für das weitere Studium der Erscheinungen der bakteriellen Dissoziation auszunutzen, die wir in der sog. Phasenselektion unserer Arbeit über die „Verbesserung der Ca-2-Keto-D-Glukonatherstellung (4) bereits empirisch und betriebsmäßig auswerteten.

Von früheren Erfahrungen und von den Bedürfnissen einer technischen Mikrobensammlung ausgehend, dehnten wir die Untersuchung in ihrer ersten Phase auf sporenbildende Bazillen, Chromobakterien, *Pseudomonaden* und Essigbakterien aus.

Die Tatsache des Auftretens mehrerer konzentrischer Zonen in den Kolonien aller untersuchter Bakteriengruppen veranlaßte uns zu ausgedehnten mikroskopischen Kontrollen (nativer und Grampräparate) des Versuchs III. und aller weiteren Versuche.

Die verblüffende Tatsache, daß fast alle untersuchten Einzelzonen in bezug auf Größe und Form, also auf die morphologischen Eigenschaften der bakteriellen Einzelzellen zwar untereinander homogen, aber fast immer von den Nachbarzonen kenntlich verschieden waren, führte uns auf den Weg dieser Arbeit, der als festgefügtter Plan die Versuche IV. bis X. umfaßt.

Die Arbeit Hutschinsons (5) wurde uns erst im Laufe unserer Experimente bekannt, aber wir kannten die differentialdiagnostischen Versuche Neumanns und Lehmanns (12) in ihrem bakteriologischen Atlas „Bakteriologische Diagnostik“, basierend auf festgefügtten, regelmäßig wiederkehrenden Kolonienformen, und gleichzeitig die im Grunde bis heute noch unvollkommen wiederlegte Ansicht der Kolle, Hetsch, Wassermann, Hutchinson (5) und aller derer, die die Kolonie ungeachtet aller auffälligen Gesamtformen als eine morphologisch nicht weiter differenzierte *Zoogloea* auffaßten.

Das Nebenergebnis der ersten Versuche war die Tatsache, daß neben der Zonenbildung ein deutlich erkennbarer Einfluß der Bodenzusammensetzung auf die dissoziative Phase der ganzen Kolonie zu erkennen war, denn die Bouillonkolonien der Sporenbildner zeigten deutlichen Roughcharakter (zerklüfteten Rand, matte, rauh bis körnige Oberfläche, Abimpfung des Bakterienmaterials in zusammenhängenden Bändern), die Biermaischekolonien Smooth-charakter/glatten Rand, glänzende Oberfläche, gute Abimpfmöglichkeit des salbenartig konsistenten Bakterienmaterials. Dieser Gegensatz wurde noch erhärtet durch den Charakter der Kolonien

auf einem aus Bouillon- und Biermaischung zu gleichen Teilen hergestellten Agarboden, die zweifelsfreie Resultanten der beiden geschichteten Dissoziationsphasen waren.

Der Plan der weiteren Arbeit, durchgeführt in den Versuchen IV., V. und VI. mußte wenigstens übersichtlich mehrere Fragen lösen und einige von ihnen ausschalten, wollten wir von der breiten Allgemeinheit des Problems zu einem besonderen, lösbaren und darum praktisch verwendbaren Einzelausschnitt als der ersten Stufe weiterer Teilarbeiten kommen.

Die Frage der Zonenbildung, die sich bei allen untersuchten Familien und Tribus ergab, mußte vereinfacht werden. Wir konnten unmöglich Sporenbildner, Chromobakterien, und oxydoreduktive Stämme in einer gemeinsamen Versuchstufe weiterbearbeiten, wenn wir tiefer schürfen wollten. Wir haben darum nur noch Versuch IV. in ganzer Breite in bezug auf die verwendeten Mikroorganismen durchgeführt (vor allem auch, um Material auf den verwendeten verschiedenen Bodenarten zu gewinnen) und beschränkten uns in Versuch V. auf die uns vor allem interessierenden, oxydoreduktiven Stämme, nachdem wir im Verhalten der Sporenbildner und Chromobakterien in IV. auf den verschiedenen Bodenarten bemerken konnten, wie verschieden und exakt auch diese Stämme auf Glukose-, Glukonatboden u. a. m. reagierten, aber wir waren gezwungen, diese interessante Aufgabe als Seitenweg aus unserem Plane zu eliminieren und für später aufzuheben.

Vier *Pseudomonas „cythro“*-stämmen (5) und vier *Acetobacter suboxydans*-stämmen (12) stellten das bakterielle Versuchsmaterial von Versuch V. dar. Die seit Versuch III. angewendete mikroskopische Kontrolle (2) der morphologischen Eigenschaften der einzelnen Zonen konnte bei Versuch IV. und V. als so ausgebaut gelten, daß es an der Zeit war, neben diesem Teste auch noch zu untersuchen, wie das homogene Bakterienmaterial, überführt in flüssige Kulturform (Subkulturen oder Isokulturen) bestimmte Kohlehydrate metabolisierte.

Wir wählten als Untersuchungsmaterial dazu Subkulturen, angelegt in je 25 ml der Bodenzusammensetzung MEL. II. (oder GAC). Lassen wir diese Bodenart durch bestimmte oxydoreduktive Stämme vergären, tritt ein Gärprozeß ein, den wir sehr genau kennen (3), (4). Es entsteht aus Ca-D-glukonat Ca-D-2-ketoglukonat, dessen Vorhandensein wir mittels Proben nach Fehling-Bertrand ohne großes Risiko eines Irrtums prüfen können.

Die mit dem Drätchen unter der Stativlupe abgeimpfte Bakterienmasse aus den jeweiligen Makrokolonienzonen impften wir unter möglichst gleichbleibenden Bedingungen in je 25 ml dieses Bodens MEL. II. und prüften die Gärergebnisse stets nach 72 Stunden stationären Gärens.

Die Vielzahl der Böden bewährte sich bei diesen Versuchen nicht, es ergab sich zwar eine Fülle von Zahlen, aber wir konnten sie nicht überblicken und nur ein wesentliches Ergebnis war das Resultat bereits des ersten Versuches: Auf der Bodenzusammensetzung GAT also auf GAT-agar gezüchtete Makrokolonien der *Pseudomonas*art „cythro“ entwickeln nach 24 Stunden 3 Zonen und zwar von außen nach innen

einen glatten, dünnen, meist farbärmeren Rand, der verm. große, längliche Bakterienindividuen etwa vom Ausmaß 0,4 bis 0,5 mal 1,0 μ aufweist,

dann folgt eine Schicht, die sich als schmaler, erhöhter Zellwall präsentiert und wir schlagen vor, sie nach dem lateinischen „vicinus“ — benachbart „Vicin“ zu nennen. Diese Schicht weist durchweg sehr kleine, kokkoide Individuen auf von 0,5 bis 0,8 μ Größe im Durchschnitt.

Dann folgt das Innere der Kolonie, Z e n t r u m oder M i t t e genannt. Es sind wieder größere Individuen, als die des „Vicins“, länglicher und mitunter erscheinen sie uns nicht ganz so homogen, wie die Rand- und die Vicin-individuen. Der Größe nach können sie manchmal schwanken, meist sind sie kleiner, als die Randzellen, aber immer größer als die Individuen des „Vicins“. Fig. 2.

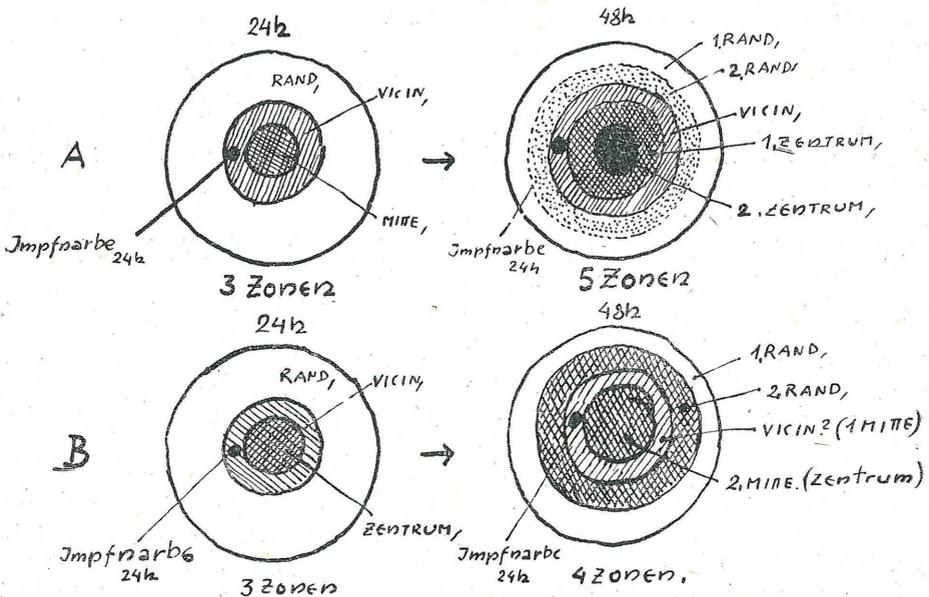


Fig. 2. Entwicklung der Makrokolonie im Aufriß.

Wächst die Kolonie länger als 24 Stunden, also 48 bis 72 und mehr, vermehren sich auch die Zonen. Wir unterscheiden nach 72 Stunden meist 4 bis 5 Zonen, einen ersten und zweiten Rand, einen „Vicin“ sowie ein erstes und ein zweites Zentrum.

Diesen morphologischen Verschiedenheiten entsprechen große Verschiedenheiten im metabolischen Verhalten der Subkulturen, die wir wie gesagt aus den einzelnen Zonen abgeimpft und 72 Stunden lang inkubiert haben.

Aber lediglich die Bodenzusammensetzung GAT ergab (laut Tabelle) regelmäßige, reproduzierbare und vor allem für die Aktivierung des Stammes verwendbare

Verhältnisse im metabolischen Verhalten von Rand, „Vicin“ und Zentrum.

Impft man diese Zonen aus einer 72 Stundenalten Makrokolonie ab, so erhält man deutliche, absolut zweifelsfreie Unterschiede, die wir aus der Tabelle III.B im Durchschnitt hier wiederholen:

1. Rand:	2. Rand:	„Vicin“	1. Zentrum:	2. Zentrum:
54,0 %	??	90,5 %	61,95 %	34,69 %

Es ist uns gelungen, diesen Vorgang mit dem der von uns in (14) beschriebenen Phasenselektion zu verbinden und diese unseren Patenten von der Biosynthese des Vitamins C beizufügen (1).

Der in Versuch V. gleichfalls untersuchte *A. suboxydans* KLUYVER DELEEUW ergab weniger klare Resultate. Im Durchschnitt ergaben Rand, „Vicin“ und Zentrum folgende Resultate: 10,52 %, 9,42 % und 12,13 %; doch sind diese keineswegs maßgebend, sondern tun nur deutlich dar, daß die morphologisch-metabolischen Zonenverhältnisse für jeden Mikroben und Boden gesondert ausgearbeitet werden müssen und daß es neben einer optimalen Bodenzusammensetzung auch ein optimales Alter für den Riesenkolonienwuchs gibt, das für *A. suboxydans* nach allen bisherigen Erfahrungen begreiflicherweise höher liegen muss, als für *Ps. „cythro“*.

In Erkenntnis dieser Tatsache schieden wir also ab Versuch VI. die Untersuchungen von *A. suboxydans* aus der Versuchsthematik aus, um sie für eine spätere Zeit aufzuheben.

Die Frage, ob Abimpfungen aus einer 72.-Stundenkolonie die optimalen sind, versuchten wir in Versuch VI. zu beantworten. Auch Versuch X. sagt über dieses Problem etwas aus.

In Versuch VI. gingen wir aus Erfahrungsgründen, die wir bei der Arbeit an der „Phasenselektion“ gewonnen haben, von 46 Stunden alten Makrokolonien aus und erhielten die gleichen Verhältnisse zwischen den Subkulturen von Rand, „Vicin“ und Zentrum auf dem Boden GAT (Tabelle III. A, B). Es ist selbstverständlich, daß die Unterschiede nicht mehr so prägnant sind, wie die von 72-Stunden-Zonen. Wir wiederholen den Durchschnitt: Rand: 10,2 %, 2. Rand 11,3 %, „Vicin“ 17,2 % und Zentrum 12,5 %. Es hat sich aber (besonders bei den in dieser Veröffentlichung nicht behandelten Arbeiten an der Biphasenselektion) (5) gezeigt, daß Passagen aus solchen „Vicin“-kulturen die besten und dauerhaftesten Inokula für weitere Versuche ergeben. Die in Versuch VII. und insbesondere Versuch X. angelegten Isokulturen aus 24-Stunden-Zonen ergaben durchweg vorzügliche Resultate. Im Vergleich zu den 48-Stunden-Zonen waren sie aber schwächer (Tabelle II.B).

Die ausgezeichneten Ergebnisse der Versuche VII. bis X. sind aber darauf zurückzuführen, daß wir anstelle unbeeinflusster Stämme bereits vorbehandelte (Makrozonen, resp. auch Phasenselektionsstämme) verwendeten.

In bezug auf die Erfahrungen mit Phasenselektionsstämmen verweisen wir auf spätere Arbeiten.

An Makrozonenstämmen interessierte uns vor allem das Verhalten

einer aus einer bestimmten Zone einer Makrokolonie entnommenen Bakterienmasse, wenn man sie wieder zum Einstich verwendete.

Solche Bakterienmassen ergeben wieder um Makrokolonien mit drei Zonen nach 24 St. und mehr Zonen nach 48, 72 u. mehr Stunden.

Die metabolischen Resultate sind aber im ganzen besser und höher, als die Resultate des unbeeinflussten Kontrollstammes aus der Konserve.

24-Stunden-Zonen ergeben von einem Makrozonstamm (der aus dem „Vicin“ einer Makrokolonie des Versuches V. stammte)

im Zentrum 24,5 % und im „Vicin“ 34,0 %,

von einem Makrozonstamm aus einer Zentrumszone des Versuches V:

22,5 % respektive 24,0 %.

Wählten wir 48-Stunden-Zonen, dann verbesserte sich dieses Ergebnis auf

36,0 % respektive

38,0 % eines Zentrumstammes

und 35,0 % respektive 46,0 % eines „Vicin“-stammes.

Um wieviel diese Ergebnisse den Kontrollstamm übertreffen, sehen wir aus folgenden Zahlen des unbehandelten Konservenstammes I₁:

24-Stunden-Zone 18 % Zentrum, 19 % Vicin,

48-Stunden-Zone 25 % Zentrum, 26 % Vicin.

Noch besser erschienen die Ergebnisse des Versuches X. der zwei Stämme vergleicht, von welchen der Makrozonstamm aus einer 24-Stunden-„Vicin“-zone folgende Zahlen ergibt:

Rand: 69 %, „Vicin“: 94%, Zentrum: 72 % und aus einer 48-Stunden-„Vicin“-Zone:

Rand: 72 %, „Vicin“: 96 %, Zentrum: 92 %. Auch der in diesem Versuche mitbehandelte Phasenselektionsstamm ergab gute Ergebnisse, die dem Makrozonstamm nicht nachstanden, hinsichtlich derer wir aber auf spätere Arbeiten hinweisen.

Die Frage der Verwendung der Bodenzusammensetzung läßt sich in unserer Arbeit nur streifen. *Ps. „cythro“* (3) hat sich auf seinem optimalen oxydoreduktiven Boden als besonders regelmäßig erwiesen. Die Zonenimpfungen seiner Gat-Makrokolonien sind entweder passagiert oder im Rahmen der patentierten Zweiphasenimpfungen für die industrielle Aktivierung dieses Stammes, dieser Art brauchbar. (Glukonatboden wirkt sowohl 100%ig, wie auch als 80 oder 50%iger Zusatz fördernd, ja selbst ein Zusatz von 20 % „entgiftet“ beispielsweise noch einen Glukoseboden für *Pseudomonas „cythro“*, reicht aber nicht mehr aus, alle seine Eigenschaften voll zu entwickeln) siehe auch (3).

Glukoseboden rein, wie auch als 80%iger, oder 50%iger Zusatz erscheint ein Hemmer, in einer Menge von 20 % schadet er weniger. Biermaische ist noch ungünstiger für *Ps. „cythro“*. Bouillon dagegen fördert mehr den Wuchs, als die metabolischen Eigenschaften dieses Mikroben.

Die Pigmentation von *Ps. „cythro“*, das heißt die Pyocyanintentwicklung (13) wird von GAT und GAT-zusätzen stark gefördert. Sowie Glukose (schon in der minimalen Menge von 0,5 %) oder die üblichen Bakteriennährsalze wie $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, KH_2PO_4 , oder $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ zum Gärsubstrat

zugesetzt werden, entwickelt sich nicht mehr Pyocyanin, sondern nur noch das zitronengelbe Hemipyocyanin. Bouillon und Bouillonzusätze fördern die Bildung eines Fluoresceins und hemmen die Pyocyaninbildung ebenfalls (13).

Für *A. suboxydans* ist der Nährboden NKT (und NKH) optimal, Glukonatboden rein und in Zusätzen förderlich, Biermaische verlangsamt seine Wuchs und seine Entwicklungsvorgänge, Bouillon aber hemmt seinen oxydoreduktiven Metabolismus, wenn auch nicht seinen Wuchs, da *A. suboxydans* auf Fleischsaftagar kleine, runde wasserhelle Kolonien bildet.

Über die Entwicklung der Makrokolonien ergaben vor allem Versuch IX. und Versuch X. eine Reihe immer wiederkehrender Beobachtungen. Beispiele für die Abschnürung und Entwicklung weiterer Zonen aus dem „Vicin“ nach beiden Seiten der Kolonie (zentripetal und zentrifugal) sind IX. 2₉ Nr. 8 und IX. I₁ Nr. 8. Fig. 3.

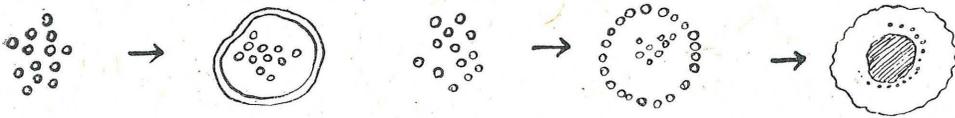


Fig. 3. Entwicklung einer Makrokolonie.
Links: Beispiel I. 1. (24/24). Rechts: Beispiel 29 (I. 2./48/24).

In Versuch X. beobachteten wir die Entwicklung einer „cychro“-Makrokolonie vom Momente des Einstichs an. Aus den Beispielen X-I₁(24/24) und X-2₉(I 2) 48/24 ergab sich Folgendes: nach 6—8 Stunden bildet sich eine ungeordnete Gruppe runder Kleinstkolonien; nach weiteren 8—10 Stunden bildet sich in der Entfernung des kommenden „Vicins“ vom Zentrum ein Kranz ebensolcher kleiner Kolonien, eine Art Prae vicin, der später zu einem zusammenhängenden Kreisring verfließt, nicht unähnlich einem Südsee-atoll, von welchem sich dann zentripetal und zentrifugal die weiteren Zonen abschnüren, bis nach 24 Stunden das Bild einer Makrokolonie geboten wird, wie wir es kennen und beschrieben haben.

V.

DISKUSSION

In einer Fülle von Versuchen, die einem Plane entsprechen, der vom Allgemeinen zum Besonderen führen sollte, haben wir uns mit den morphologischen und metabolistischen Verhältnissen auseinandergesetzt, die sich bei der Bildung von Riesenkolonien mittels Einstichs in ein geeignetes, starres Medium ergaben.

Wir konnten konkret folgende absolute Arbeitsergebnisse erzielen:
1. Makrokolonien vier großer Bakteriengruppen bilden auf den verschiedensten Nährböden konzentrische Zonen. Wir untersuchten Sporenbildner, Chromobakterien, *Pseudomonaden* und Essigbakterien.

2. Sporenbildner entwickeln auf Bouillon-agar Rough-form, auf Biermaische Smooth und auf einer Mischung beider das zweifelsfreie Mittel beider Dissoziationsphasen.

3. Pseudomonaden, Beispiel *Ps. „cythro“*) und Essigbakterien bilden auf Bodenarten, die eine ausgeprägte Oxydoreduktion zulassen, nach 24 Stunden drei, später mehr Zonen, Fig. 4, einen dünnflächigen, zarteren Rand mit größeren Stäbchenformen, einen schmalen, aber erhöhten Zellwall mit kleinen kokkoiden Formen, den „Vicin“ und die Mitte oder des Zentrum, das einen Übergang zwischen Rand und Zentrum in bezug auf Individuenform und -größe zeigt. Fig. 5.

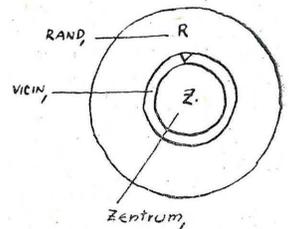


Fig. 4.

4. Die morphologischen und metabolistischen Verhältnisse dieser Zonen konnten für den Mikroorganismus *Ps. „cythro“* auf GAT-agar als regelmässig und reproduzierbar nachgewiesen werden. Eine Übersicht der reproduzierten, oxydoreduktiven Ergebnisse der Rand-, „Vicin“- und Mittelkulturen auf GAT bilden folgende Zahlen:



Fig. 5. Makrokolonie im Durchschnitt. Schwarze Kreise deuten die „Vicinal“-schicht an.

Bakt. bez:	Stamm bez:	Rand: 0/o	Rand: 2. 0/o	Vicin: 0/o	Zentr.: 0/o	Zentr.: 2. 0/o	Alter d. Kol:	Alter des Fehlg:	Versuchs-Nr:	Bemerkungen:
„cythro“	G4	57,5	—	97,5	40,6	—	72 St.	72 St.	V.	
„cythro“	B12	—	—	77,5	66,3	61,3	72 St.	72 St.	V.	
„cythro“	D12	50,0	—	96,5	79,0	8,13	72 St.	72 St.	V.	
„cythro“	PQ8/1	11,0	—	12,0	10,0	—	46 St.	72 St.	VI.	
„cythro“	PQ8/2	10,0	9,0	15,5	15,0	—	46 St.	72 St.	VI.	
„cythro“	PQ8 - -	10,0	12,0	16,5	15,0	—	46 St.	72 St.	VI.	
„cythro“	PQ8/4	10,0	13,0	25,0	10,0	—	46 St.	72 St.	VI.	
„cythro“	PQ8 ₂ 5	—	—	24,0	22,0	—	48 St.	72 St.	IX. 2a	Makrozone zentr.
„cythro“	PQ8 ₂ 5	—	—	38,0	36,0	—	48 St.	72 St.	IX. 2a	Makrozone zentr.
„cythro“	PQ8AV	—	—	35,0	24,5	—	24 St.	72 St.	iXA 1a	Makroz. „vicin“
„cythro“	PQ8AV	—	—	46,0	35,0	—	48 St.	72 St.	iXA 1a	Makroz. „vicin“
„cythro“	PQ1/2a	—	—	19,0	18,0	—	24 St.	72 St.	iXA 2a	Kontrollstamm
„cythro“	PQ1/2b	—	—	26,0	25,0	—	48 St.	72 St.	iXA 2b	Kontrollstamm
„cythro“	XI 1	—	—	100,0	100,0	—	48/24	72 St.	X/1 ₂ 1	Makr. „vicin“ VI
„cythro“	XI 1	—	—	88,0	72,0	—	24/48	72 St.	X/1 ₂ 2	Makr. „vicin“ VI
„cythro“	XI 1	72,0	—	92,0	84,0	—	48/48	72 St.	X/1 ₂ 3	Makr. „vicin“ VI
„cythro“	XI 1	76,0	—	100,0	84,0	—	24/72	72 St.	X/1 ₂ 4	Makr. „vicin“ VI

5. Beobachtungen über Wuchs und Entwicklung der Makrokolonien wurden während der Versuche (insb. IX. und

X.) gemacht. Ihnen zufolge bildet der „Vicin“ zentripetal und zentrifugal neue Zonen. Die abgeschnürten Zonen verlieren die „Vicin“-Eigenschaften, der „Vicin“ bleibt aktiv.

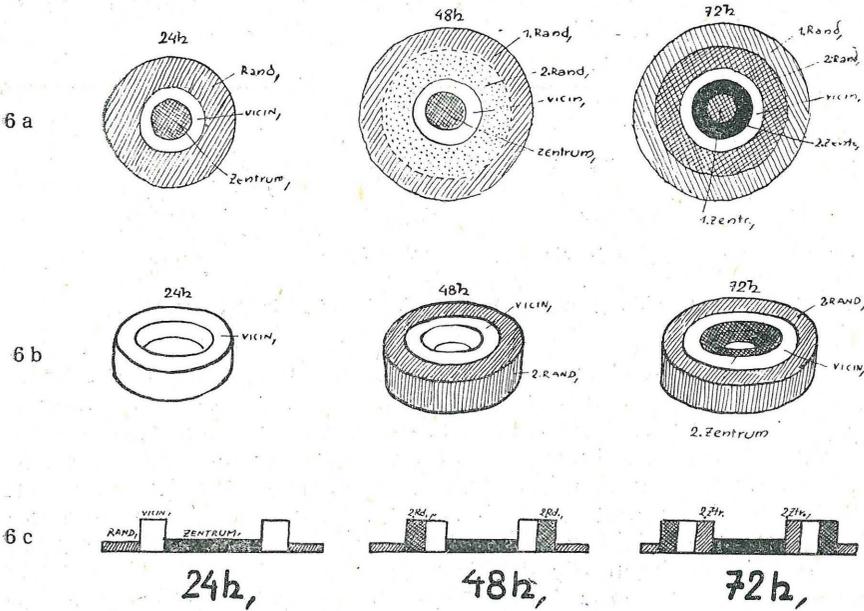


Fig. 6a. Entstehung neuer Zonen im Aufriß der Makrokolonie, welche der Vicin zentripetal und zentrifugal gebildet hat.

Fig. 6b. Schematische Darstellung der Abschnürung neuer Ringzonen zentripetal und zentrifugal aus dem „Vicin“.

Fig. 6c. Schematische Darstellung der Entwicklung neuer Makrozonen nach 24, 48 und 72 Stunden im Durchschnitt.

6. Beobachtungen über die Entwicklung einer Riesenkolonie vom Zeitpunkt des Einstiches an ergaben folgendes Bild:

- 6—8 Stunden nach dem Einstich bildet sich eine kleine Gruppe kleinster runder Kolonien rund um den Einstich.
- 8—10 Stunden später Bildung eines Kranzes solcher Kleinstkolonien in der Entfernung des späteren „Vicin“ vom Einstich.
- Dieser Kranz verfließt in einen zusammenhängenden Ring, eine Art „Prae-vicin“, der die künftige Makrokolonie durch Abschnürung neuer Zonen nach beiden Seiten bildet. Fig. 7.

Das Verhältnis dieser klar gewonnenen Gesichtspunkte zum unübersehbaren Anfangsmaterial ergibt als einen der wichtigsten erlangten Grundsätze:

Bevor wir zu solchen synopsisartigen Arbeiten schreiten können, wie sie uns von Hutchinson (5), Neumann-Lehmann (12), Serkovski (6) oder

anderen vorliegen, muß zunächst für jeden einzelnen Mikroben auf ganz bestimmtem eng definiertem, starrem Medium unter eindeutigen Bedingungen Entwicklung, Wuchsform, Morphologie und Metabolismus der Kolonie und ihrer morphologisch unterschiedenen Teile erprobt sein!

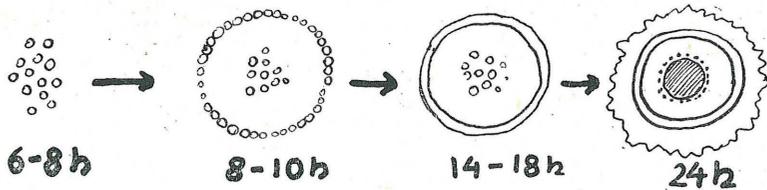


Fig. 7. Die Entwicklung einer Makrokolonie in 24 Stunden.

Wir sehen aus dem Beispiel „*cychro*“-GAT-Rand-VICIN-MITTE-24-48-72 Stunden, bei welchem uns die Erfüllung dieser Forderungen gelungen ist und aus dem Beispiel *A. suboxydans*, das wir aus dieser Arbeit ausscheiden mußten, weil die technischen Voraussetzungen noch nicht gegeben waren, es zu erfüllen, wieviel Arbeit noch zu leisten ist, solch ein Gesamtthema zu lösen und weshalb so interessante Arbeiten, wie die Serkovskis, aber auch die Hutchinsons scheitern mußten (insbesondere, weil allgemeine Richtlinien für die Lösung dieses Problems zunächst undenkbar sind) oder daß diese Arbeiten zu Fehlschlüssen führen mußten, deren auffälligster die ungelöste Diskrepanz in der Arbeit Hutchinsons ist zwischen CHARAKTERISTISCHER Kolonienarchitektur und (angeblich) fehlender mikroskopischer Differenzierung der Kolonien-schichten oder Teile.

Billigen wir also auch zunächst unserem Arbeitsergebnis für „*cychro*“ GAT nur individuelle, ja orientierende Bedeutung zu, wäre es dennoch ein Fehler zu übersehen, was die Übertragung der Bakterienmasse aus Makrokolonienzonen mittels Einstichs in neue Makrokolonien gebracht hat.

Zunächst konnte die Tatsache enttäuschen, daß es sich um keinen genetischen Prozess handelt, sondern daß ohne Rücksicht darauf, ob das Einstichmaterial z. B. aus einem „Vicin“ oder einem Zentrum stammte, um den Einstich wider drei- und später mehrzonige Makrokolonien erwachsen.

Wer aber die Erscheinungen der bakteriellen Dissoziation genau studiert hat, wird nichts anderes erwartet haben. Der Übergang der Formen von S zu R und so weiter ist wohl ein nicht ganz unähnlicher Vorgang, wie das immer wieder neue Entstehen des Randes, des Vicins und des Zentrums und so fort. Ja, es ist nicht ausgeschlossen, daß wir zwischen diesen beiden durch das Leben vor sich gehenden Differenzierungsprozessen später noch mehr Berührungspunkte finden könnten. Vorderhand wäre es verfehlt, ja könnte es als teleologischer Missgriff ausgelegt werden, versuchten wir in dieser Arbeit mehr zu registrieren, als die faktischen Unterschiede morphologischer und metabolischer Natur, wie wir sie beschrieben haben.

Die Tatsache des Übergangs einer Phasenform in die andere, wie wir sie unseren empirischen Aktivationsversuchen in unserer Arbeit von der Phasenselektion (4) zugrundegelegt haben, die eine Frage des Zeitfaktors ist und zu einem Optimum des Alters einer Phasenkolonie von 46 Stunden geführt hat, bietet nichtdestoweniger analogische Momente zum zeitlichen Vorgang des Abschnürens der Makrozonen, denn es ist uns gelungen nachzuweisen, dass 46—48 Stunden alte „Vicin“-zonen die aktivsten Inokula liefern, ähnlich, wie 46 Stunden alte Phasenformen von „Cychro“-kolonien die aktivsten Phasenstämme. Aber vorderhand können wir nichts, als diese Tatsache registrieren.

In diesem Zusammenhange sei darauf hingewiesen, wie wichtig es war, in dieser Arbeit jene Beobachtungen zu sammeln, die ein zentripetales resp. zentrifugales Abschnüren von Zonen durch den „Vicin“ erfaßten. Das war nicht nur wichtig, sondern auch schwer. Allein das Verfolgen der Impfnarbe einer 24 Stundenkolonie konnte 24 Stunden später, also in der 48 Stundenkolonie zu den größten Irrtümern führen und unsere arbeitshypothetischen Bezeichnungen 1. Rand, 2. Rand, 1. und 2. Zentrum beweisen, daß wir auch wirklich anfangs solchen Irrtümern zum Opfer fielen. Die Impfnarbe kann aller Exaktheit und der Stativlupe zum Trotz an drei verschiedenen Orten in der „Vicin“-zone 24 St. liegen und so drei verschiedene Fälle verursachen: Fig. 8.

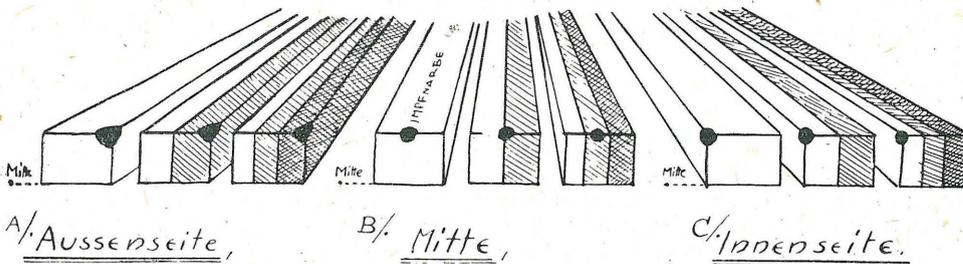


Fig. 8. Schematische Darstellung des Abschnürens neuer Zonen aus dem ursprüngl. „Vicin“ (weißer Balken) nach 24 (einfach schraffierter Balken) und nach 48 Stunden (doppelt schraffierter Balken). Im ersten Falle liegt die Impfnarbe — 24 St. an der Außenseite der „Vicin“, rutscht also scheinbar in den zweiten und in den 3 Ring der abgeschnürten Zonen. Im zweiten Falle liegt die Impfnarbe — 24 St. genau in der Mitte, rutscht also nur in die zweite Zone. Im dritten Falle liegt sie an der Innenseite und das ist der einzige Fall, in welchem die Impfnarbe in jener Zone, in der sie ursprünglich war, bleibt.

Wie die drei Bilderskizzen zeigen, entstehen drei anscheinend ganz verschiedene Situationen, die alle derselben Erscheinung angehören. Die Beobachtungen in Versuch VII., IX. und X. ermöglichten uns, dieser Gefahr zu begegnen und heute sollten wir lieber von einem Ur-„vicin“, einem 2. 3. und so weiter -„vicin“ sprechen.

Im ganzen soll diese Arbeit nichts vermitteln, als die Registration der tunlichst geordneten Folge unserer Beobachtungen, die sich um die Tatsache gruppieren, dass *Pseudomonas „cychro“* auf GAT-agar-medium nach 24 Stunden drei Zonen bildet, Rand, „Vicin“ und Mitte, von denen der „vicin“ eine Zone mit den kleinsten kok-

koiden Bakterienelementen darstellt und die aktivsten Subkulturen abgibt.

Die optimalen Ergebnisse sind von einem 46 Stunden alten „Vicin“ zu erwarten. Hat man die Makrokolonie aus der Bakterienmasse des Vicins einer früheren Makrokolonie angelegt, erscheinen die Ergebnisse besser selektiert.

ZUSAMMENFASSUNG

Es gelang uns, auf verschiedenen festen Medien mit verschiedenen Agarzusätzen von 5 %, 3 %, 2,5 % und 2 % Trockenagar, am besten aber mit 2,5 % Agar Makrokolonien verschiedener Bakteriengruppen zu züchten. Es wurden sporenbildende Bazillen, Chromobakterien, *Pseudomonaden* und *Acetobacter*-arten untersucht.

Unter diesen Stämmen und Arten haben wir den oxydoreduktiven Industriestämmen, also *Pseudomonas*- und *Acetobacter*-arten besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Ganz besonders charakteristisch zeigten sich die Stämme von *Pseudomonas* „*cychro*“. Diese *Pseudomonas*art (3) bildet auf allen untersuchten Nährböden nach 24 Stunden Makrokolonien mit drei, nach 48—72 Stunden mehr klar abgeteilten Zonen.

Nach 24—48 Stunden unterschieden wir einen Rand, auf den ein erhöhter Zellwall folgte und eine Mitte, die wir Zentrum nannten. Den erhöhten Zellwall schlugen wir vor „Vicin“ zu nennen (vom lateinischen vicinus-benachbart).

Diese Zonen sind in bezug auf Größe und Form der sie bildenden Bakterienindividuen sowohl morphologisch (makroskopisch und mikroskopisch) als auch in der metabolistischen Aktivität ihrer Subkulturen (Isokulturen) stets von einander verschieden.

Bei *Pseudomonas* „*cychro*“ haben wir auf seinem oxydoreduktiv optimalen Nährboden GAT (Tafel IV.A) bei 28 Grad Celsius beobachtet, daß 72 Stunden alte Subkulturen der einzelnen Zonen reproduzierbare Unterschiede im Grad der Vergärung der Kohlenstoffquelle aufweisen und zwar liefert die Zone „Vicin“ die weitaus aktivsten Subkulturen. (Ca-D-glukonat wird zu Ca-2-Keto-D-Glukonat vergoren.)

Bei 72 Stunden alten Makrokolonien stellten wir größere Unterschiedsspannen zwischen den Subkulturergebnissen unter gleichen Bedingungen fest, bei 46 Stunden alten Makrokolonien die aktivsten und dauerhaftesten Inokula für weitere Industrieversuche.

Bei Verwendung des Mediums GAT sind diese Verhältnisse für *Ps.* „*cychro*“ reproduzierbar und geben so die Richtung weiterer Arbeiten an. Unter dem Namen Zweiphasenselektion haben wir die Methode der Makrokolonien mit der erwähnten Aktivierung von *Ps.* „*cychro*“ für Industrieversuche mit der Phasenselektion kombiniert und den Patentanmeldungen 109—55 und 110—55 von der Biosynthese des Vitamins C einverleibt (1).

Ferner haben wir in der vorgelegten Arbeit eine Reihe weiterer Beobachtungen gesammelt, die sich auf das Wachstum dieser Makrokolonien beziehen. Nach ihnen bildet sich etwa 6—8 Stunden nach dem Einstich ein Häufchen runder Kleinstkolonien um denselben und weiteren 8—10 Stunden in der Entfernung des künftigen „Vicins“ ein atollför-

miger Kranz solcher kleiner Kolonien, die bald zu einem einheitlichen Ring verfließen, einer Art „P r a e - v i c i n“. Dieser „P r a e - v i c i n“ beginnt nun nach zwei Seiten, also zentrifugal und zentripetal neue Zonen abzuschneiden, bis nach 24 Stunden das erste Bild der Makrokolonie fertig ist.

Die Absicht in der vorliegenden Arbeit eine Übersicht unserer Beobachtungen zu geben, kann als erfüllt betrachtet werden, wenn wir diesen Erkenntnissen, an denen wir weiterarbeiten, Orientierungswert zumessen.

BEMERKUNGEN

1) Patentanmeldungen 109-55 und 110-55 (auf die Namen Dr. Gerhard Färber, Ing. Olga Vondrová-Hovězová und Dr. Bedřich Lukšík). Es handelt sich in diesen Patenten um die gärungsmässige Herstellung von 2-Keto-L-Idonsäure und ihre Salzen und um ihre Verwendung zur Biosynthese des Vitamins C. In diesen Patenten ist die Zweiphasenselektion mitverwendet.

2) Mikroskopische Untersuchung eines Abstriches aus den jeweiligen Makrozonen kann als Kontrolle verwendet werden, ob man nicht trotz der Anwendung der Stativlupe daneben gefahren ist. Die Einheitlichkeit der Individuengröße und -form ist in jeder Zone gegeben.

3) *Pseudomonas „cythro“*, 15. XI. 1945 von G. Färber aus einer Mikrobenkonserve isoliert und beschrieben, Zkušnosti s nově izolovaným vysoce oxydativním barevným mikroorganismem, G. Färber, Sborník ČAZ XXIII sešit 5, 355 ff, März 1951: Kleine, kokkoide Stäbchen, auf den meisten Böden geissellos; entwickelt neben einem Fluorescein Pyocyanin, unterscheidet sich aber von *Ps. aeruginosa* dadurch, daß *Ps. „cythro“* nicht denitrifiziert, Gelatine nicht verflüssigt, von C-quellen Glukose, Maltose schlecht verträgt, Idonsäure, Ribonsäure und Galaktonsäure im Gegensatz zu *Ps. aeruginosa* ausgezeichnet und rasch vergärt (C. Färber, Dissertation 1951, O. Vondrová, G. Färber, B. Lukšík, Čs. biol. 1954 3/2 99ff.)

4) *Československá biologie* 3 (1954) Heft 2, 99—107. Olga Vondrová-Hovězová, Gerhard Färber, Bedřich Lukšík: Zlepšení kvasné výroby Ca-d-2-Ketoglukonanu využitím bakteriijní disociace. (Verbesserung der gärungsmässigen Herstellung von Ca-d-2-Ketoglukonat mittels der bakteriellen Disseziation.)

5) Zweiphasenselektion, Teil der Patente 109-55 und 110-55, siehe auch 1). Wir bemerken, dass wir über die Einzelheiten dieses Teiles aus Patentgründen nichts verlauten lassen konnten und verweisen in bezug auf die Zweiphasenselektion auf eine spätere Arbeit.

6) siehe 1) und 2).

7) GLUK-ID-syrup ist das Hydrogenationsprodukt (unter Hitze und Hochdruck) des Glukose-Gärungsproduktes Ca-5-keto-D-Glukonat und enthält 50 % Ca-D-glukonat und 50 % Ca-L-Idonat. Ein mittels der Zweiphasen- oder auch nur der Phasenselektion aktivierter Stamm *Ps. „cythro“* vergärt dieses Produkt bis zum Abbau des Ca-D-Glukonanteiles zu reinem Ca-2-keto-L-Idonat oder Provitamin c.

8) PQ 1 entstammt einer 11 Jahre alten „*Cythro*“-konserve aus dem Jahre 1945, die wir noch heute gebrauchen.

9) Phasenkolonie: Abkürzung für die Beschreibung der durch die Phasenselektion ausgewählten optimalen Kolonie.

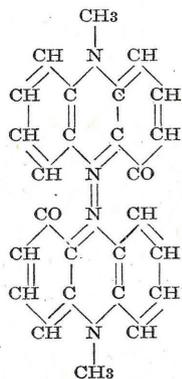
10) *Československá biologie* 3 (1954) 2, 99ff O. Vondrová-Hovězová, G. Färber, B. Lukšík. Zlepšení kvasné výroby Ca-d-2-ketoglukonanu využitím bakteriijní disociace [siehe auch⁴).

11) *Pseudomonas „cythro“* siehe 3).

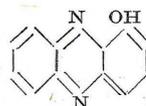
12) *Acetobacter suboxydans* KLUYVER-DELEEUW, von Kluyver und Deleeuw 1924 entdeckt und als „merckwaardige Azijnbakterie“ in der holländischen

Tijdschr. Vergelijk Geneeskunde 10, 170ff (1924) beschrieben. Kleines, fast kokkoides Kurzstäbchen, gramnegativ, höchst oxydoreduktiv, färbt Jodschwefelsäure blau, vergärt D-Sorbit zu L-Sorbose. Glukose und Glukonat zu 2keto- und 5ketoglukonat. Wird von Bergey als besondere Art, von Krasilnikov aber nur als Unterart von *A. Melanogenum anerkannt*.

13) **Pyocyanin**, ein Phenazinderivat: thermostabil, giftig, bisher als org. Pigment von *Pseudomonas aeruginosa* bekannt. Wird auch von *Ps. „cychro“* und sicher noch anderen unbek. Pseudomonasarten gebildet. Unter dem Einfluß von Glukose und Salzen geht es in Hemipyocyanin, alfa-Hydroxyphenazin über. Die Chloroformlösung von Pyocyanin ist tief blau, in wässriger HCl geht es in weichselrotes Erythrocyonin über,



Pyocyanin



Hemipyocyanin

14) **Glukonatboden GAC** (ist gleich MEL II) hat folgende Zusammensetzung: 50 g Ca-D-Glukonat, 5 g D-Glukose, 25 ml 20% Hefeautolysat (entspr. 0,5% Frischhefe) 2 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1 g KH_2PO_4 , 250 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und ad 1000 ml Wasser. Auf diesem Boden erzielen wir (ČAZ XXIII-5-355) die Vergärung einer 15% C-Quelle in 20 Stunden. Auf diesem Boden bildet *Ps. „cychro“* Hemipyocyanin und nur gelegentlich spät erst Spuren von Pyocyanin.

15] Čs. biol. 3 (1954) 2, 99ff, (siehe auch 4) und 10).

16) Der Unterschied zwischen 20% und 80% Medienzusätzen zu Mischungen ergab bisher in dieser Versuchsanordnung keinerlei klare Anhaltspunkte für die Untersuchung der Metabolismusunterschiede der einzelnen Zonen. Dafür war sie hinsichtlich ihres Einflusses auf die Pigmentation interessant.

17) Diese Einschränkung entspricht der Korrektur der Versuchsbreite. In Versuch VI. ließen wir *A. suboxydans* deswegen beiseite, weil die erzielbaren allgemeinen Werte eines solchen Vergleichs in Versuch V. erschöpft erschienen und eine gründlichere Beschäftigung mit diesem Mikroben eine neue Arbeit nötig machen wird.

18) ČAZ, XXIII, 5, 355ff, vide 3).

19) siehe 17). Darum haben wir *A. suboxydans* und seine weitere, genauere Untersuchung ausgeschaltet.

20) Čs. biol. 3 (1954) 2, 99 siehe 4), 10) und 15).

21) 2,5 % Trockengearzusatz zu diesen Platten, hat sich als Optimum erwiesen.

22) **GLUK-ID-SYRUP**, Hydrogenat unter Hitze und Hochdruck aus Ca-5-keto-D-Glukonat [siehe auch 7)].

23) Versuch VIII als technischen Gründen ausgeschaltet.

24) PQ 8, die Grundlage dieser „cychro“-Stämme entstammt der 6 Jahre alten Konserve XV (21. I. 48) die 6. 11. 50 und 4. I. 55 mit je 15 ml frischen Mediums ergänzt wurde.

25) Diese Urkonserve I 1 wurde im Dezember 1945 angelegt, ist zurzeit 11 Jahre alt. Sie wurde 9. 9. 48—9. 8. 50 und 4. I. 55 durch je 15 ml flüssiges GAT ergänzt.

LITERATURVERZEICHNIS

A. Bakterienmakrokolonien

- a) Fraenckel (1894): Beitrag zur Erkenntnis des Bakterienwachstums auf eiweißfreien Nährböden. — Hygien. Rdsch. IV. 762 ff.
- b) Hoffmann Fr. (1894): Vereinfachung bei bakteriellen Züchtungsmethoden. — Wschr. Brauerei, Cbl. Bakt. 1 (2) 252 ff.
1. Jegunov (1896): Die mechanische Analyse der Bakterienplatten. — Cbl. Bakt. 2 (2) 467
2. Beijerinck M. W. Delft. (1896): Emulsions- und Sedimentsfiguren bei bewegten Bakterien. — Cbl. Bakt. 2 (2) 40, 14—15.
- c) Weigmann Dr. H. (1899): Versuch einer Voreinteilung der Milchsäurebakterien im Molkereiwesen (verwendet Kolonieformen). Cbl. Bakt. 5 (2) 869 ff.
3. Burri R. (1898): Das Vorkommen von verhm. großen Kolonien in fehlerhaftem Ementalerkäse. Cbl. Bakt. 4 (2) 611 ff.
6. Serkowski St. 1901: O budowie kolonii bakteryjnych (ueber den Bau der Bakterienkolonien. — Pamietnik Towarzystwa lekarzkiego Warszawskiego XVC 2/3 Cbl. Bakt. 7 (2) 391 ff.
4. Will H. (1906): Einführende Bemerkungen über die Morphologie. — Cbl. Bakt. 15 (2) 243 ff.
5. Hutchinson H. B. (1907): Ueber Form und Bau der Kolonien der niederen Pilze. — Cbl. Bakt. 17 (2) 65, 129, 321, 417, 593 ff.
7. Münden (1892): Beiträge zur Cytoblastenfrage. — Cbl. Bakt. 5 (2).
8. Axelrad Caesar (1903): Ueber Morphologie der Kol. path. Bakt. — Zschr. Hygien. 44.
9. Flügge C. (1893): Die Mikroorganismen. — Cbl. Bakt. 1 (2).
10. Jendrassek (1891): Ueber Geometrie regelmäßiger Bakterienkolonien. — Kochs Jber. 1891/43.
11. Gottschlich in Flügge a. a. O. (1895): Aetiologie der Mikroorganismen.
12. Lehmann K. B. u. Neumann R. O. (1920): Bakteriologische Diagnostik. — München 1898—1920.
13. Baerthlein K. (1918): Ueber bakterielle Variabilität, insb. sog. Bakterienmutationen. — Cbl. Bakt. 1 (81) 369—435, 176—196.
14. Hadley P. (1927): Microbic Disociation. — J. inf. Diseases 40, 1—312.
15. Gostěv V. S. (1931): Biochemičeskije osnovy medicinskoj bakteriologii. Moskau.
16. Gračeva N. P. (1946): Napravlennaja izmenčivost kišečnoj paločki. — Agrobiologija 3, 136 ff.
17. Gamaleja N. P. (1947): Vospominanija. Izdat. — AN-SSSR.
18. Málek I. (1946): Proměnlivost Bakterií I. — Thomayerova Sbir. 239.
- Málek I. (1951): Proměnlivost mikroorganismů v sovětské vědě. Thomayerova Sbir. 293, 7.
- Málek I. a Wagner Vl. (1948): Mikrobiologické vyšetřovací metody a stručná diagnostika v praxi. Praha, nákl. Spol. českých lékařů.
19. Färber G., Vondrová O. (1956): Symbiosen und Metabiosen in aufgefaultem Obst. Sborn. nár. Mus. Im Druck.
20. Vondrová O., Färber G., Lukšík B. (1954): Zlepšení kvasné výroby Ca-D-2-ketoglukonanu využitím bakteriální disociací. — Čs. biol. 3 (2) 99 (1953).
21. Färber G. (1951): Zkušenosti s nově izolovaným vysoce oxydativním barevným mikroorganismem. — Sborn. ČAZ. 23, 5, 355 ff.
22. Dubos R. J. (1946): The Bacterial Cell. — Cambridge-Harvard.
23. Kluyver A. J. Deleeuw F. J. G. (1924): A. Suboxdans und merkwürdige Azijnbacterie. — Tijdschr. Vergelijk Geneeskunde 10, 170 ff.

B. Hefenriesenkolonien

1. Schönfeld (1895): Uebersicht über die Methode der Reinzüchtung v. Mikroben. — Cbl. Bakt. 1 (2) 180 ff.
- Koch R. (1895): Mitt. Kais. Ges. amt. Cbl. Bakt. 1 (2).
- Petri (1887): Ueber Plattentechnik. — Cbl. Bakt. 1 (2), 9.
- Delbrück M. (1895): Natürliche Hefenreinzucht i. d. Praxis. — Wschr. Brauereiwesen 12, 4 ff Cbl. Bakt. 1 (2) 732 ff.

- Brefeld (1896): Untersuchungen aus dem Gesamtgebiet der Mykologie. — Cbl. Bakt. 2 (2) 535 ff.
- Schönfeld (1899): Untersuchungen der Betriebshefen auf Rassereinheit. — Wschr. Brauereiwesen 16, 147 f.
- Eliessen M. Weende (1901): Einfluß des veget. Zustandes versch. Hefen auf ihr Vermehrungs- und Gärvermögen. — Cbl. Bakt. 7 (2) 497 ff.
- Hansen E. Chr. (1904): Neuere Untersuchungen über den Kreislauf der Hefenarten. — Cbl. Bakt. 10 (2) 1 ff.
- Lindner P. (1904): Aus den Verhandlungen der Sect. VI: Gärgewerbe und Hefefabr. — Cbl. Bakt. 10 (2) 355 ff.
- Jahn (1905): Der Zellbau und die Fortpflanzung der Hefe. — Cbl. Bakt. 11 (2) 411 ff.
- Hansen E. Chr. (1906): Grundlinien zum System der Saccharomyceten. — Cbl. Bakt. 12 (2) 529 ff.
- Lindner P. (1906): Zur Einführung der Preßhefe von sparrigem Typus. — Zschr. Spiritus 27 (22), 225—226.
2. Osterwalder A. (1906): Ein weiterer Beitrag zur Kenntnis unserer Obstweihen. (Auf Seite 39 Riesenkolonien behdlt.) — Cbl. Bakt. 16 (2) 35 ff.
- Regensburger Paul (1906): Vergleichende Untersuchung von drei obergärigen Arten von Hefe. (Seite 474 ff. und Tafeln I, II und III: Riesenkolonien.) — Cbl. Bakt. 16 (2) 438—481.
- Hutchinson H. D. (1907): Ueber Form und Bau der Kolonien der nied. Pilze. (Dieser Autor behandelt auch Hefenriesenkolonien). — Cbl. Bakt. 17 (2) 65, 129, 321, 417 und 593 ff.
- Will H. (1904). Vergleichende Untersuchung von vier untergärigen Arten von Bierhefe: VI. Wachstumsformen der vier Hefen auf festen Nährböden, C: Wachstumsform der Riesenkolonien auf Würze-agar und Würzeagargelatine. — Zschr. Brauereiwesen 27, 578 ff.