

# SBORNÍK NÁRODNÍHO MUSEA V PRAZE

## ACTA MUSEI NATIONALIS PRAGAE

Volumen XIII. B (1957) No. 1—2

REDAKTOR ALBERT PILÁT

GERHARD FÄRBER—OLGA HOVĚZOVÁ—VONDROVÁ:

### Symbiosy a metabiosy nahnílého ovoce

Pokus o analysu a resynthesu nahnílych ovocných plodů (jablek) s ohledem na prokvašování D-glukosy v Ca-D-glukonan a dále v keto-glukonany.

Vypracováno v oddělení mikrobiálních sbírek Biologického ústavu ČSAV za vedení ředitele akademika Dr Ivana Málka.

### Symbiosen und Metabiosen in faulendem Obst

Ein Versuch Mikrofloren angefaulter Obstfrüchte (Äpfel), zu analysieren und im Hinblick auf die Vergärung von D-Glukose zu Ca-D-glukonat und weiter zu Ketoglukonaten zu resynthetisieren.

Diese Arbeit wurde in der Abteilung „Mikrobensammlungen“ des Biologischen Institute der ČSAV unter der Leitung des Direktors Akademiemitglied Dr. Ivan Málek durchgeführt.

1. Provedli jsme pokusy za účelem prozkoumání mikrobiálních společenstev v nahnílych jablkách, jež nám umožnily vypracovat vhodnou metodiku k zjištění členů těchto symbios a metabios. Metabolická a ekologická analysa umožnila další přesnější práci.

2. Společenstva, na podzim odočkovaná z materiálů, který počal hnití ve volné přírodě, se skládají ze sym- i metabiontů, jejichž rychlost v odbourávání D-glukosy a tvorba Ca-D-glukonanu, Ca-2-keto-D-glukonanu i Ca-5-keto-D-glukonanu je pravidelná a lze ji reprodukovat. U „jarního ovoce“ (plodů, které hnily v uzavřených prostorách) je velmi zeslabená a zpomalená.

3. Metabolické vlastnosti celých společenstev jsou ve většině případů lepší než u jednotlivých mikroorganismů.

4. Jednotné faktory (permutace kmenů, množství subkultury) jednotlivých symbiontů-členů zkoumané symbiosy (č. 19, říjen 1952), použitých jako inokulí, a časové intervaly mezi spojením jednotlivých kmenů umožnily přesnější resynthesu symbiosy č. 19 s chybou 0,05 %.

Časový interval byl 18hodinový, inokulum všech 3 kmenů 0,5 ml.

# I.

## EINLEITUNG

Über sogenannte Symbiosen mikrobieller oder halbmikrobieller Natur liegt eine so reiche Literatur vor, daß wir es uns versagen mußten, alle die ausgewählten Arbeiten, die wir gelesen haben, im Verzeichnis anzuführen.

Diese Literatur ist im Hinblick auf das unübersehbare Thema, wie zu erwarten ist, sehr uneinheitlich. Darum haben wir alle Arbeiten, die mit unserer Aufgabe durch nichts mehr verbunden waren, als durch den Begriff „Symbiosen“ ausgeschieden. Es handelt sich um 22 größere Arbeiten.

Die einen Autoren interessieren sich für die Wechselwirkung lediglich zweier Bakterien, wie etwa *L. leichmannii* und *Leuconostoc citrovorum* (1), oder sie gehen von bestimmten Metaboliten aus, wie beispielsweise B12 und beschäftigen sich dann mit ganzen Gruppen wie etwa *Lactobacilli* und *Propionibacteria* (2) u. a. m.

Oder es sind mehr antagonistische, als symbiotische Erscheinungen, welche interessieren (3).

Sehr viel Autoren bearbeiteten von den Kindheitstagen der Bakteriologie an die Leguminosensymbiose mit den Knöllchenbakterien (4) und allein durch die genaue Angabe aller dieser Arbeiten hätte man das Verzeichnis vervielfachen können.

Es interessieren Bakterien und Virusformen (5), Bakterien und Algen, wie *Volvox* und *Azotobacter* und fast ebenso reich ist die Summe der Arbeiten über die Nitrifikation im Boden (6), die sehr viel und sehr bedeutende Autoren, wie S. Winogradskij und A. A. Imšeneckij als Folge symbiotischer Lebensvorgänge sehen. Eine klare Übersicht über Arbeiten auf diesem Gebiete hat J. Vintika gegeben (7). Auch andere Gebiete kommen zu Worte: Die alte, bekannte Symbiose der intestinalen Mikroben, weiters der chitinolytischen intestinalen Bakterien von Gastropoden, wie *Helix pomona* (8). Auch Essigbakterien melden sich als Kontaminanten (9), die unserem Arbeitsgebiete näherstehen.

Wir fanden schließlich auch Literatur über die Obstfäule selbst, vor allem in der älteren Zeit (11). Es ist klar, dass diese sich lediglich auf die Untersuchung der an der Braunfäule beteiligten *Fungi imperfecti* beschränkte. Arbeiten über *Botrytis*, *Sclerotinia-Monilia*, der damaligen Nomenklatur entsprechend, finden sich um die Jahrhundertwende.

Neben A. Osterwalder, der ein *Fusarium putrefaciens* nova species für gewisse Braunfäulen verantwortlich machte, ist der Hauptautor C. Wehmer in seiner Arbeit Untersuchungen über die Fäulnis von Früchten, Jena, Fischer 1895 überzeugt davon, daß die Bewirker der Braunfäule neben den erwähnten *Fungi imperfecti* vor allem Schimmel sind, wie *Mucor stolonifer*, *piriformis*, *Penicillium italicum*, *olivaceum* usw. und von Bakterien fällt kein Wort, Wehmer geht auf ältere — die einzigen wie er sagt — Arbeiten von Davaine und Brefeld ein und auch dort ist nur von Schimmeln die Rede (11).

Es ist aus der Themenstellung unserer Arbeit heraus zu verstehen,

daß wir nur schwer von dieser Literatur ausgehen konnten und daß uns auch ihr Studium während der Zeit unserer Versuche nur teilweise unterstützen konnte, weil Wesen und Ziel unserer Arbeiten von den erwähnten Publikationen verschieden sind.

Durch Arbeiten anderer Autoren, die ähnlich wie in (9) angeführt ist, technische Mikrobenstämme kontaminationsfest zu züchten versuchten, durch eigene Arbeiten an künstlich, also willkürlich zusammengesetzten „Symbiosen“, weiters beim Suchen aktiver Industriestämme an natürlichen Fundorten, wie es faulende Äpfel sind, machten wir uns mit den mikrobiellen Verhältnissen des faulenden Obstes in der Weise bekannt, wie sie in dieser Arbeit behandelt ist.

Mechanische Verletzungen der Kutikularschicht solch eines Apfels zum Beispiel führen zur Infektion durch *Fungi imperfecti*, bei welcher sog. Braunfäule (im Gegensatz zu der durch *Botrytis cinerea* verursachten Schwarzfäule) durch Kontamination mit *Sclerotinia Fuckelinana* oder *fructigena*, entsteht. Diese beiden „Schimmel“ bedingen aber nicht selbst das eigentliche Faulen des Fruchtfleisches des angefallenen Apfels, auch sind es nicht in erster Linie Hefen, obwohl man dies aus der Produktion von Äthanol im faulenden Fruchtfleische schliessen könnte, sondern in erster Linie Bakterien.

Eine Fülle empirischer Beobachtungen, die wir gelegentlich anderer Arbeiten sammeln konnten, veranlaßte uns, eine Methodik auszuarbeiten, die wir in dieser Arbeit vorlegen, mittels welcher wir diese Beobachtungen erhärten konnten, sodaß sie ein biologisches Bild vom Zusammenleben der mikrobiellen Satelliten des parasitischen Apfelkontaminanten *Sclerotinia* skizzieren.

Es waren vor allem drei Beobachtungen, die sich beim Suchen und Prüfen von Sym- und Metabiontengruppen der Apfelfäule immer wieder einstellten:

1. Die ersten Sym- und Metabionten eines solchen Apfels sind Bakterien und zwar vor allem, ja manchmal sogar ausschließlich Essigbakterien.

Diesen Essigbakterien folgen Hefen (Saccharomycesarten und Toluraarten) durchschnittlich nach etwa einer Woche und noch später Schimmelpilze aus der Gattung *Penicillium*, *Aspergillus* und *Rhizopus* u. a.

2. Die zweite Beobachtung bezog sich auf den Zeitpunkt, in welchem der Apfel zu faulen begann. Herbstsym- und -metabiosen sind weit einheitlicher zusammengesetzt, als Frühjahrssymbiosen und sind als Ganzes viel aktiver bei der Vergärung von saturierter D-Glukose zu Ca-D-glukonat und weiter Ca-2-keto-D-glukonat oder Ca-5-keto-D-glukonat, bewirkt durch Essigbakterien, wie *Acetobacter melanogenum* oder *Acetobacter suboxydans* K l u y v e r - D e l e e u w.

Wir erklären uns diesen Vorgang aus der Tatsache, daß Herbstfrüchte von der Kontamination am Baume oder im Gartengrabe angefallen werden, Frühjahrsfrüchte aber in abgeschlossenen Räumen zu faulen beginnen.

3. Sym- resp. Metabiosen von faulenden Äpfeln in geeignete synthetische Testböden überimpft, vergären D-Glukose rascher und vollkommener, als ihre einzelnen Glieder; und das auch dann, wenn sich bei der

Untersuchung herausstellt, daß einzelne Teilgruppen der untersuchen Symbiose nicht immer einheitlich auf einander symbiotisch wirken müssen.

Es ist uns gelungen, für alle drei Beobachtungen ausreichendes Material zu erlangen. Durch eine in Kapitel II. spezifizierte Methodik ist es uns geglückt, die sym- vor allem aber auch die metabiotischen Verhältnisse zu erfassen und dadurch die Arbeit aus der Ungewißheit des Rätselratens in ein wenigstens in groben Zügen definiertes System zu bringen. Die ungemene Schwierigkeit dieses Beginnens wird einem klar, wenn man bedenkt, daß drei Abimpfungen aus einem eben angefallenen, einem halbverfaulten und einem völlig in Braunfäule übergegangenen Apfel etwa 2000 Sym- und Metabionten ergeben und läßt es begreiflich erscheinen, daß wir den Ergebnissen unserer Methodik trotz der Fülle der Zahlen zunächst nur Orientierungswert zubilligen.

Auf Grund der in dieser Arbeit vorgelegten Versuche bemühten wir uns eine sehr einfache (dreigliedrige) Symbiose im Hinblick auf Inokulummenge und Zeitintervall des Zusetzens zu resynthetisieren.

Es ist uns gelungen ein solches Beispiel mit einer Differenz von 0.05 % durchzuführen.

Dieser Beitrag zum Problem der Sym- und Metabiosen soll dazu dienen und dabei behilflich sein, die Arbeiten an ökologischen und metabolistischen Werten symbiotischer und metabiotischer Gärungen zu unterstützen. Er soll orientieren und nach Möglichkeit dazu beitragen, eine Übersicht zu gewinnen.

Es ist uns eine angenehme Pflicht, an dieser Stelle unserem Vorgesetzten, Akademiemitglied und Vorstand der biologischen Sektion der CSAV, Prof. I v a n M á l e k, Dr. d. mediz. Wissenschaften zu danken, für Rat, Hilfe und jahrelanges Vertrauen, das er uns besonders während dieser Arbeit erwiesen hat. Sodann danken wir den Mitarbeitern unserer Abteilung für ihre aufopfernde Hilfe.

## METHODIK

In den Jahren 1952—1955 führten wir im Biolog. Institut der Tschechoslovakischen Ak. d. Wiss. 10 sehr reichgliederte Versuche (mit durchschnittlich je 144 Beispielen) durch, für die eine Methodik angewendet wurde, die wir bei Versuch Nr. 1/1952 (ovoce + + +) entwickelt haben.

Zu dieser Methodik führte uns eine Reihe von Beobachtungen, auf Grund von häufigen Stichproben, daß sich die mikrobielle Gesellschaft während der Versuche änderte. In die Reihe dieser Beobachtungen gehört auch die in der Einleitung erwähnte Folgte Bakterien-Hefen-Schimmel.

Versuch Nr. 1/1952 war der erste unserer Versuche, der systematisch auf Grund dieser Methodik durchgeführt wurde. Wir verwenden zur Erfassung neu isolierter Mikroorganismen aus natürlichen Fundorten vier Prototypen von Medien, die Glukose, Glukonat, Biermaische und Bouillon enthalten. Von Milch, bzw. Laktose-Galaktosemedien sahen wir auf Grund bisheriger Erfahrungen ab. Die auf diesen Böden gedeihenden Milchsäurebakterien und anderen Mikroben der Milch lassen sich ebenso lückenlos durch die Kombination von Glukose-Biermaische- und Bouillonmedien erfassen.

a) Das Medium NK(T)<sup>1)</sup> enthält D-Glukose als typische C-Quelle für Essigbakterien, fallweise auch andere Mikroben aus der Gruppe der Milchsäurebakterien, sporenbildenden Bazillen, Chromobakterien, für Hefen und Schimmelpilze.

b) Ca-D-Glukonatboden [GAT]<sup>1)</sup> fördert vor allem Wachstum der chromogenen und chromophoren Mikroben, der Pseudomonas- und Chromobakterienarten, der Mikrokokken usw., fördert die Pigmentbildung bei Mikroorganismen und vor allem oxydoreduktive Vorgänge. Hefen und Schimmelpilze wachsen auf diesem Medium etwas langsamer und schwächer.

c) Ungehopfte Biermaische (8<sup>0</sup> Balling)<sup>1)</sup> fördert zwar das Bakterienwachstum ebenfalls mäßig, weit besser aber Hefen und später Schimmel.

d) Fleischbrühe hemmt Hefen und Schimmelwachstum zugunsten der Bakterien und fördert ganz besonders die Entwicklung bestimmter Mikroorganismengruppen, wie *Escherichia*, *Klebsiella*, aber auch *Streptococcus* und *Aerobacter*. Es wachsen indes auf Bouillon auch andere Gruppen wie Pseudomonasarten, selbst Essigbakterien und so fort.

Als Impfstellen des Faulapfels wählten wir eine Stelle der angegriffenen Cuticula und das Innere des faulenden Fruchtfleisches bzw. dessen Saft.

Um die verschiedenen Intervalle des Faulens richtig zu erfassen, wählten wir einen ein wenig angefaulten Apfel, impften ab, in etwa 8—10 Tagen erfaßten wir die Halbfäule und nach einem etwa gleichlangen Intervall noch einmal den ganzverfaulten Apfel. (Tab. A2, A3.)

Die Beobachtung, daß sich die mikrobielle Zusammensetzung in ein und derselben Kultur im Laufe der Gärung änderte, war der Grund, daß wir in 24stündigen Intervallen vier Tage hindurch aus solch einer flüssigen Kultur Schiefagarrabstriche anlegten.

Diese Schiefagarröhrchen unterwarfen wir gleichermaßen nach 24, 48, 72 und 96 Stunden einer Analyse der Sym- resp. Metabionten und erzielten mit dieser Methodik von drei Stadien der Fäulnis eines Apfels von Cuticula und Apfeinnerem — 384 Subkulturen (bei 5tägiger Beobachtung sogar 750).

Anfangs verfolgten wir Ökologie und Metabolismus solcher Kulturen im Rahmen eines Versuches und erzielten so zwar eine tiefere Einsicht in das Problem, sahen aber schon nach einigen Versuchen (1—6), daß wir eine so weite Aufgabe so nicht meistern konnten. So beschränkten wir uns im Folgenden darauf, Ökologie oder Metabolismus zu untersuchen.

1) Nährbödenzusammensetzungen:

NKT	NKH	GAT	GAC
50 g	50 g D-Glukose	50 g	50 g Ca-D-Glukonat
—	5 g Ca-D-Glukonat	—	5 g D-Glukose
125 ml	25 ml 20 % Hefeautolysat	125 ml	25 ml 20 % Hefeautolysat
—	2 g NH <sub>4</sub> / <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	—	2 g NH <sub>4</sub> / <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
—	1 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	—	1 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
—	250 mg MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	—	250 mg MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O
ad 1000	ad 1000 Wasser	ad 1000	ad 1000 ml Wasser

die übrigen Zusammensetzungen befinden sich im Text. Feste Platten- und Schrägagarmedien enthalten je nach Versuchsanordnung 2, 2,5, 3 im Anfange sogar 5 % Trockenagar.

Der Versuch einer Resynthese wurde in mehreren Vorversuchen vorbereitet. Es wurde nach einigen Orientierungen eine dreigliedrige Symbiose (Nr. 19 des Versuches Nr. 4 vom 25. III. 1953) ausgewählt und diese sowohl im ganzen, als auch analysiert in einzelne Glieder auf ihr symbiotisches, indifferentes oder antagonistisches Verhalten geprüft. Dies geschah zunächst einmal simultan, indem Glieder in gleichen Inokulumsmengen einzeln und nach Permutationsgesetzen angesetzt wurden. Sodann wurden die Inokulumsmengen (0,25—0,5—1,0 ml) abgewandelt und schließlich die Zeitintervalle der Zusammensetzung einer optimalen Stämmefolge. Die Glieder der Symbiose wurden jeweils nach 18, 24, 48 und 72 Stunden dem Gäransatz in je einer Menge eines halben ml unter gleichen Bedingungen zugesetzt.

Die Untersuchung der Ergebnisse des Metabolismus erstreckte sich auf das Absinken der Cu-reduktiven Zuckermenge der C-Quelle mittels der Methode nach Fehling-Bertrand oder der ebullioskopischen Methode. Die Feststellung der entstandenen Menge von Ca-5-keto-D-glukonatkristallen wurde durch Dekantation, Auswaschen, Grobgewicht und Feingehalt festgestellt. Viele dieser Arbeitsergebnisse sind in der vorliegenden Arbeit vorerst als Resumé vertreten.

Die Ermittlung der ökologischen Verhältnisse geschah durch mechanisches Abimpfen mittels Drähtchen von Schiefagarröhrchen und nachfolgender Kultivierung respektive Reinigung mittels der Plattenstrichmethode.

Von Chromatographie und Reindarstellung der Metabolite als Substanzen sahen wir mit Rücksicht auf die ungemaine Vielzahl der Kulturen, die kleinen Mengen in den angewendeten Erlennmeyerkölbchen (25 ml flüss. Mediums) und den orientierenden Charakter unserer Arbeit ab.

## EXPERIMENTELLER TEIL

(Zu den eigenen Versuchen.)

Im Folgenden berichten wir von experimentellen Erfahrungen bei der Durchforschung der Mikroflora angefaulten Obstes. Auch bereits mitgeteilten Gründen hat es sich notwendig gezeigt, besonders ausgedehnte und darum unübersichtliche Versuche als Beweis auszuschalten.

Versuche an anderen Arten von Früchten, wie Birnen, Aprikosen, Weinbeeren, Bananen und dgl. haben wir nicht mitberücksichtigt, obwohl wir viele derartige Experimente gemacht haben, weil sie das Bild der Beweisführung durch ihre Unübersichtlichkeit trüben würden. Wir konnten dies mit umso besserem Gewissen tun, als die Ergebnisse der Arbeit mit diesen Früchten denen der Äpfel durchaus ähnelten, aber keine solch günstige Regelmäßigkeit aufwiesen.

Wenn wir aus unseren vier Standardböden für die Untersuchungen des Metabolismus D-Glukose und Ca-D-glukonatböden aussuchten, so geschah dies deshalb, weil Glukose und Glukonat in gut definierter Linie des Gärvorgangs liegen und zu weiteren Gärzwischenprodukten wie Ca-2-keto-D-glukonat und Ca-5-keto-D-glukonat führen, die leicht zu

erfassen sind, vorausgesetzt daß ihre Haupterzeuger, die Essigbakterien am Werke sind.

Da aber nach unseren bisherigen Erfahrungen im braunfaulen Apfel Essigbakterien das Feld in der ersten Gärphase beherrschen, glauben wir zu unserem Vorgehen berechtigt zu sein.

Ca-2-keto-D-glukonat konnte in 25 ml-Kulturen nur in der Reduktionskurve<sup>2)</sup> nachgewiesen werden, während Ca-5-keto-D-glukonat als kristallinischer Niederschlag (in großen oder kleinen Kristalldrüsen) durch Dekantieren, Auswaschen, Trocknen und Bestimmung des Grob- und Feingewichts erfaßbar war.

Durch eine genau definierte Menge Ca-5-keto-D-glukonats und durch die Feststellung des Verlaufes der Reduktionskurve<sup>2)</sup> mittels Fehling-Bertrandproben oder ebullioskopisch können wir das richtige Stadium der Durchgärung in Prozenten oder in Gramm-Miligrammwerten erfassen.

Die Tatsache, daß es sich — insbesondere bei den wirksamen Herbstsymbiosen — in der ersten Phase um eine durch Essigbakterien hauptbestimmte Mikroflora handelt, haben wir durch viele Analysen festgehalten.

Zum Schluß haben wir eine der Symbiosen der Herbstes 1952 (Sigma 19) analysiert und zwar im Rahmen des Versuches Nr. 4 (1953)<sup>3)</sup> und ihre drei Stämme unter genau definierten Bedingungen künstlich zusammengestellt. Es ist uns gelungen, die natürliche Symbiose in ihrer metabolistischen Tätigkeit mit einer Fehlerspanne von 0,05 % zu erreichen.

Bild Nr. I und II. zeigt eine der erzielten symbiotischen Platten. Im Laufe der Arbeit haben wir uns immer mehr auf die Isolierung von 5-keto-Stämmen beschränkt, wobei die Wichtigkeit dieses Metaboliten für die Vitamin-C-biosynthese der Industrie das Argument seiner gewichtsmäßigen und chemischen leichten Erfassbarkeit unterstützte.

Die vorgelegte Arbeit behandelt also aus der Vielzahl aller Versuche folgende Abschnitte:

Den Metabolismus der Mikroflora angefaulter Äpfel im Herbst nach der Ernte und im Frühjahr bei der Lagerung.

Eine Analyse der erlangten Mikroflorkulturen im Hinblick auf ihre metabol. Wirksamkeit gegen D-Glukose.

Den Versuch der Resynthese einer künstlichen Mikrofloragruppe nach natürlichem Muster.

---

<sup>2)</sup> Es handelt sich hier um die bekannte Methode nach Fehling-Bertrand derzufolge reduzierende Substanzen (Zucker, Zuckerketosäuren u. a.) Kupfersulfat zu Kupferoxydul reduzieren. Da das aus D-Glukose gebildete Ca-D-Glukonat nicht reduziert, sinkt die Reduktionskurve nach Vergärung der Glukose auf Null um nach dem Beginne der Bildung von Ca-2-keto-D-Glukonat wieder anzusteigen. Da diese Reduktionskurve bis auf den Umstand, daß der Nullwert meist nur annähernd erreicht wird, sehr zuverlässig ist, kann sie in unseren auf sehr viele kleine Mengen Gärsubstrates ausgedehnten Orientierungsversuchen als beweiskräftig angesehen werden.

<sup>3)</sup> Zur Symbiose Sigma 19: Die in unserer Arbeit verwendete Symbiosenreihe des Versuches Oktober 1952 wurde konserviert und im Frühjahr 1953 als 4. Passage erneut untersucht. Wir wählten zu unserer Beweisführung eine absolut negative Symbiose Nr. 1, die wir der Passagenreihe nach dem Versuch im Frühjahr 1953 entnommen haben, nachdem wir uns überzeugt hatten, daß Nr. 1 wirklich Glukose kaum angreift. Nr. 3 und Nr. 19) identisch mit Nr. 16 der ursprünglichen Reihe sind gegen Glukose sehr aktiv.

## Der Metabolismus der Mikroflora eines angefaulten Apfels im Herbst und im Frühjahr gegen D-Glukose.

Bei einer großen Reihe von Orientationsversuchen wurde das Übergewicht von 5-ketogenen Essigbakterien festgestellt. Es handelte sich dabei vor allem um Herbstversuche. In einem Versuche vom Oktober 1952 wurden 16 Organismengruppen analysiert und ihre oxydoreduktive Aktivität wurde nach 24, 48, 120 und 144 Stunden am Absinken der D-Glukosewerte mittels Fehling-Bertrand geprüft. Es ergaben sich folgende Werte:

Tabelle A IV:

Organismengruppe:	24St.	48St.	120St.	144St.	Bemerkungen
1	74,0	50,0	41,5	7,8	Die angeführten Werte entsprechen den Prozenten der Kupferreduktion der Fehling-Bertrandschen Proben. Es handelt sich also um noch unvergorene Restglukose einer 5%igen C-quelle.
2	—	41,5	34,0	0,0	
3	78,0	65,0	31,0	0,0	
4	67,0	57,0	35,0	11,0	
5	89,0	66,0	43,0	2,0	
6	52,0	—	34,0	13,0	
7	72,0	38,0	29,0	23,0	
8	54,0	41,5	25,25	9,8	
9	58,0	41,5	18,95	12,0	
10	—	38,0	30,0	14,0	
11	—	41,5	15,0	11,0	
12	66,0	41,5	5,0	0,0	
13	63,0	38,0	42,0(?)	5,0	
14	87,0	41,5	14,0	13,0	
15	—	38,0	15,0	17,0	
16	63,0	38,0	25,0	12,4	

Ein weiterer Versuch mit Organismengruppen von den gleichen, natürlichen Fundorten, die wir konserviert hatten, wurde im März 1953 durchgeführt. Die anderen Bedingungen dieses Versuches, der nichts anderes, als eine Passagierung des ersten darstellt, waren sonst die gleichen.

Es wurden folgenden Ergebnisse erzielt:

Tabelle A V:

Organism. gr:	0 St.	24 St.	48 St.	72 St.	96 St.	120 St.	144 St.	
1	92,0	41,0	wächst	nicht, dickt sich ein				Prozente der Restglukose der Gärung nach Fehling Bertrand, sonst gleich falls wie die Tabelle A IV.
2	99,5	90,0	72,0	64,0	58,7	56,0	—	
3	94,0	41,5	12,4	9,15	7,7	15,7	—	
4	96,5	77,0	66,5	41,5	41,0	30,0	6,15	
5	96,5	77,0	59,0	49,0	43,24	31,09	4,24	
6	84,0	34,0	56,0	5,7	9,4	7,57	0,00	
7	97,5	—	91,3	wächst nicht weiter, eingedickt				
8	96,7	87,9	64,0	23,0	12,0	5,5	9,5	
9	96,7	49,0	15,3	5,3	5,3	0,65	21,8	
10a	96,7	73,0	55,3	11,35	6,0	3,8	6,79	
10b	98,69	98,0	86,49	eingedickt, wächst nicht.				
11	87,5	40,8	45,3	6,0	4,6	8,3	23,65	
12	90,8	63,0	11,35	3,2	—	1,62	8,3	
13	100,0	wächst	nicht	95,0	87,5	81,35	35,13	
14	89,0	50,0	11,35	6,0	5,5	1,08	0,0	
15a	95,5	70,0	40,08	38,31	36,5	12,0	9,5	
15b	96,65	55,4	30,0	4,0	6,15	4,6	0,0	
16	90,75	47,3	17,5	12,6	4,6	6,15	13,51	

Beim Vergleich dieser beiden Versuche mit gleichem Materiale von gleichen Fundorten und möglichst angepaßten Bedingungen mit dem einzigen Unterschiede des Zeitpunktes sowie des Umstandes, daß es sich um zwei Passagen aus der gleichen Quelle handelt, erkennen wir nur verhältnismäßig kleine Differenzen in der Aktivität.

Die Zahl der aktiven Symbiosen ist bei Passage I (Herbst 52) größer: 2, 3, 4, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16 in Gegensatz zu Passage II (Frühjahr 1953): 3, 9, 10a, 14, 15b, 16. Auch finden wir bei Passage II. eine Reihe von Symbiosen, die nicht weiter wuchsen und metabolisierten (1, 7, 13) oder nur schleppend gärten (2, 4, 13).

Dieses Ergebnis darf aber nicht verwechselt werden mit den Resultaten aus dem Vergleich richtiger Herbst- und Frühlingssymbiosen, den wir im Folgenden behandeln werden. Es lehrt, daß sich auch Mikroben-gesellschaften natürlicher Fundorte<sup>4)</sup> (im Weiteren als Symbiosen bezeichnet) genau so aufbewahren lassen, wie reine Einzelstämme und daß sie bei der „Wiederbelebung“ verhm. wenig an Aktivität verlieren (Hier im Hinblick auf den Glukosemetabolismus).

Daraus geht hervor, daß es sich bei diesen Symbiosen von einheitlichen Fundorten doch um genauer definierbare Komplexe handelt, mit denen zu arbeiten wir lernen könnten. Die beobachteten quantitativen Differenzen der Aktivität des Glukosemetabolismus können durch die Dauer der Konservierung, ihre hier verwendete Art der einfachen Luft-trocknung, aber auch durch die Tatsache der Aufbewahrung im geschlossenen Raum hervorgerufen sein. Es ist nicht ausgeschlossen, daß auch der Zeitpunkt im Hinblick auf Faktoren, wie Temperatur, Feuchtigkeit usf. einen Einfluß haben konnte, keinesfalls können sich aber diese Ergebnisse mit dem Unterschiedsbilde messen, das wir gewinnen, wenn wir Symbiosen in ihrer Aktivität des Glukosemetabolismus vergleichen, die wir von herbst- und frühjahrsfaulen Früchten gewonnen haben, deren Fäulnis spontan vor sich gegangen ist.

#### Symbiosen von herbst- und frühjahrsfaulen Früchten:

Tafel A VI gibt die Reduktionswerte der Fehlingsproben gleichfalls in Prozenten der Restglukose an. So entsteht folgendes Bild der Gär-vorgänge von 8 Symbiosen 8 herbstfauler Äpfel des mährischen Ortes Hermanic:

---

4) Der Begriff „Symbiose“ wird in dieser Arbeit der Einfachheit wegen anstelle eines Begriffes „Mikrobielle Gesellschaft“ verwendet. Mikroflora wollten wir mit Rücksicht auf die häufige andersartige Verwendung dieses Begriffes nicht sagen, um Mißverständnissen auszuweichen. Der Begriff „Symbiose“ definiert aber nur das Zusammenwirken mehrerer Organismen auf Grund gegenseitigen Nutzgenusses gleichzeitig. Der Begriff „Metabiose“ ist ebenfalls genau definiert. Da es sich in unserer Arbeit um die Untersuchung der gegenseitigen Verhältnisse von Sym- und Metabionten handelt, sind wir uns der Ungenauigkeit des verwendeten Begriffes „Symbiosen“ bewußt.

Stamm:	24 St.:	48 St.:	72 St.:	96 St.:	120 St.:	Bemerkungen:
NI 1	40,5	20,2	8,45	4,7	4,75	Apfel Heřmanic. Nr 1.
NI 2	62,7	4,7	7,55	5,75	4,70	Apfel Heřmanic. Nr 2.
NI 3	28,8	27,2	7,45	5,75	8,45	Apfel Heřmanic. Nr 3.
NI 4	28,8	27,0	14,9	4,75	4,70	Apfel Heřmanic. Nr 4.
NI 5	28,8	25,4	5,75	4,70	8,45	Apfel Heřmanic. Nr 5.
NI 6	35,0	32,3	5,75	5,75	0,00	Apfel Heřmanic. Nr 6.
NI 7	22,0	20,6	5,75	4,15	0,00	Apfel Heřmanic. Nr 7.
NI 8	17,0	16,15	4,70	0,00	—	Apfel Heřmanic. Nr 8.

Dieser Versuch beweist nicht nur eine besonders starke Aktivität dieser Apfelsymbiosen beim Abbau der D-Glukose, sondern lieferte uns viel 5-ketogene Stämme mit einer großen Intensität für die Bildung von Ca-5-keto-D-glukonat für die Mikrobensammlungen.

Im Gegensatz zu diesem Herbstversuch sind Gärteste von frühjahrsfaulen Äpfeln sehr schlecht ausgefallen. Einen typischen Versuch SYHO I-SgO/12-27 IV. 1955, den wir in Prag aus Heřmanicer Äpfeln anlegten, die wir gesund nach Prag gebracht hatten und die uns in der Speisekammer zu faulen begannen, legen wir in Tabelle A VII vor:

Symbiose:	Datum:	—St.:	20St.:	48St.:	72St.:	96St.:	120St.:	144St.:	240St.:	336St.:	360St.:
Apfel 1. inn.	12. IV. 55	82,5	87,5	91,0	66,0	63,0	62,8	55,5	42,3	27,4	10,6
Apfel 2. inn.	12. IV. 55	91,0	82,0	80,3	71,0	65,3	59,5	54,5	46,3	42,0	39,0
Apfel 3. inn.	12. IV. 55	87,5	89,3	66,0	63,5	—	64,3	54,5	51,3	43,0	25,0

Aus den beiden Tafeln A VI und A VII ersehen wir, daß zwar auch die Frühjahrskulturen D-Glukose regelmäßig abbauen, daß dieser Prozeß aber erheblich langsamer ist. Auf Tafel VII mußten wir darum über 120 Stunden hinaus die Zeitintervalle 144, 240, 336 und 360 Stunden zurate ziehen und stellten fest, daß auch noch nach dieser Zeit eine beachtliche Menge Restglukose vorhanden ist, während die Herbstäpfel gleicher Provenienz ihre Glukose bereits nach 72 Stunden verbraucht hatten.

#### Analyse der Aktivität des Glukosemetabolismus einzelner Symbiosen in ihrer Glieder.

Diese Analysen liefern unübersehbares Material. Als Beispiele solcher Analysen haben wir besonders typische Symbiosen ausgewählt. Es sind dies Nr. 1, 3 und 19 der erwähnten Versuche des Jahres 1952 und 1953. Von diesen Symbiosen ist Nr. 1 eine Symbiose mit negativen Gärerergebnissen, während 3 und 19 besonders aktiv beim Glukoseabbau sind.

Unter Analyse des Glukose-Metabolismus verstehen wir die Isolation ihrer einzelnen Glieder, die wir dann unter völlig gleichen Bedingungen auf gleichem Nährboden (Glukose-Nährboden NK)<sup>1</sup> gären lassen. Durch den Vergleich der Gärkurven dieser einzelnen Glieder untereinander und mit den Ergebnissen der Gesamtsymbiose, erhalten wir dann eine große Übersicht über das metabolische Verhalten dieser Glieder gegen Glukose.

#### Symbiose Nr. 1 (negativ)

Die mikrobiologische Analyse ergibt 8 Stämme, welche unter die Schleimbildner, Sarcinen und gramnegative Stäbchen, gehören. Es handelt sich im besonderen um:

zwei nicht näher bestimmte  
 vielleicht  
 zwei verschiedene gramnegative Stäbchen und ein  
 kokkenähnliches Gebilde, das nicht näher identifiziert wurde.

*Aerobacter polymyxa,*  
*Aerobacter aerogenes,*  
*Aerobacter cloacae,*  
*Sarcinen,*  
*Micrococcus candidus,*

Keines dieser Glieder, neun Tage lang beobachtet, entwickelte eine besondere Aktivität beim Abbau der D-Glukose des NK-Nährbodens. Das Gleiche beobachteten wir an den Gärkulturen des Gesamtkomplexes der Symbiose.

### Symbiose Nr. 3.

Im Gegensatz zu Beispiel 1<sup>6)</sup> liefert das Beispiel 3 (Oktober 1952) sechs Stämme, die sich in Metabolismustesten, mikroskopisch, bei der Gramfärbung, gegen Jod-Schwefelsäure und so weiter als Essigbakterien erwiesen. Auch ihr makroskopischer Eindruck bestätigt das. Sie bilden wasserhelle, gelblich gefärbte, runde Kolonien, die gramnegative Kurzstäbchen enthalten, ja manchmal kokkoide Formen. Auf D-glukose-Agarröhrchen mit Kreide bilden sie durchsichtige Höfe und zuletzt 5-Ketoglukonatkristalle. Eine nähere Analyse ergab folgende Stämme:

- A. suboxydans,*
- A. melanogenum,*
- A. aceti,*
- A. vini acetati*

sowie eine Art Acetobacter, die unserem Industriestamm FA-MEL<sup>7)</sup> nahe kommt.

Die Gärprozente der gesamten Symbiose und ihre Einzelglieder lassen sich folgendermaßen ordnen:

Tabelle A VIII:

Bezeichnung	0 St.	24 St.	48 St.	72 St.	96 St.	120 St.
<b>Gesamtsymb.</b>	<b>96,5</b>	<b>40,0</b>	<b>21,5</b>	<b>8,83</b>	<b>7,43</b>	<b>15,4</b>
3/1a	89,1	78,2	65,0	64,5		17,5
3/1b	85,5	71,0	66,5	62,5		12,0
3/2	91,7	83,5	66,3	53,8		4,25
3/3	95,0	90,0	88,23	87,5		81,5
3/4	85,75	71,5	60,0	53,0		12,5
3/5	92,5	85,0	48,3	—		21,3

<sup>6)</sup> Symbiose Nr. 1 (April 1953) ist eines der wenigen negativen Beispiele, aus einem Faulapfel abgeimpft, die Glukose kaum angreifen. Die Analyse der Glieder ergab eine Bestätigung dieser Erkenntnis. Der Richtigkeit unserer Methodik, dargetan an Symbiose Nr. 3 und Nr. 19 wird durch den Vergleich mit den Ergebnissen aus 1. erhärtet.

<sup>7)</sup> FA-MEL ist eine Industriebezeichnung für einen von G. Färber 1945 aus einem Faulapfel isolierten *Acetobacter*, welcher in der Industrie zur raschen Vergärung von Ca-D-glukonat zu Ca-D-5-ketoglukonat verwendet wurde. *Acetobacter spec. FA-MEL* ist weder mit *A. suboxydans* noch mit *A. melanogenum* identisch, aber sehr verwandt. Sein Charakteristikum ist ein gelblich-weißer Anflug auf Schrägagarrasen nach 4—5 Tagen, Glukosescheu, Geißeln, größeres kokkoides Stäbchen. 28 Grad C. optimale Temp.

Hat sich die Desaktivität des Beispiels 1 in seinen Gliedern bestätigt, so zeigt die Aktivität der Einzelstämme des Beispiels 3, daß sie in ihrem Glukosemetabolismus nicht nur verschieden sein können (wie 3/2 und 3/3), sondern auch insgesamt schwächer sind, als die ganze Symbiose.

### Symbiose Nr. 19.

Genau die gleichen, günstigen Verhältnisse finden sich auch bei Symbiose Nr. 19 (Oktober 1952). Der Glukose-Metabolismus der Gesamtsymbiose ist deutlich besser und geht rascher vor sich, als der der einzelnen Glieder. Die Stämme dieser Symbiose sind durchweg Essigbakterien und zwar unterscheiden wir:

- A. suboxydans*
- A. melanogenum*
- A. xylinoides*.

Ein Vergleich der 3 angeführten Beispiele in Prozentzahlen der reduktiven Kraft gegen Glukose bestätigt diese Erkenntnis.

Tabelle A IX zeigt:

Bezeichnung:	0 St.:	25 St.:	48 St.:	72 St.:	96 St.:	120 St.:	144 St.:
Gesamtsymb.	95,6	98,3	17,9	12,4	12,65	5,15	13,8
19/1a	86,3	72,5	52,5	34,6	—	20,0	—
19/1b	87,5	75,0	48,3	32,0	—	41,3	—
19/2	—	67,5	41,3	32,0	—	25,0	—
19/3	85,0	—	—	—	—	27,0	— <sup>8)</sup>

Ähnliche Verhältnisse fanden wir nicht nur bei fast allen dieser 19 Symbiosen, sondern auch dort, wo wir auf verwandte oder gleiche Bedingungen stießen. Im weiteren gehen wir von dieser Symbiose Nr. 19 aus.

### Der Versuch der Resynthese einer natürlichen Symbiose, abgeimpft im Herbst aus dem Inneren eines faulen Apfels (Symb. Nr. 19 [Oktober 1952]).

Die Nachbildung natürlicher Verhältnisse versuchten wir bei der Mikroorganismengruppe Nr. 19 durch eine stufenweise durchgeführte Vereinigung der Glieder in verschiedenen Variationen der Stämme nach mathematischen Permutationen, Variationen der Inokulummengen und in verschiedenen Zeitintervallen durchzuführen. Durch diese Kombinationen gelang es uns, die natürlichen Voraussetzungen mit einer Genauigkeit von 0,05 % innerhalb eines Gärvorgangs zu erreichen, der 5 Tage währte.

Die Resynthese wurde vorgenommen:

- I. unter gleichen Zeit- und Volumenkautele,
- II. in verschiedenen Zeitintervallen,
- III. bei Verwendung verschiedener Inokulummengen der einzelnen Glieder.

<sup>8)</sup> Alle verwendeten Nährböden enthalten 5 % der C-quelle im Liter

## A X.

Gruppe Nr. 19. Stämme 1, 2, 3, (1=1a+1b)

Oxydoredukt

Aktivität:	0 St.:	24 St.:	48 St.:	72 St.:	96 St.:	120 St.:	144 St.:
der Gesamtsymb.	93,6	48,3	17,9	12,4	12,7	5,95	13,8
der einz. Glieder							
1/19/1a	86,3	72,5	52,5	34,6	—	20,0	—
19/1b	87,5	52,5	48,3	32,0	—	41,3	—
2	—	48,3	41,3	32,0	—	25,0	—
3	85,0	41,3	—	—	—	20,7	—

## I.

### Wiedervereinigung der Stämme unter gleichen zeitlichen und mengenmäßigen Bedingungen:

Bezeichnung der Stämme	Inokulum-Menge	Verhält. d. Inokul.	Alter d. Kultur	Wieviel % Restglukose bleibt übrig nach			
				48 St.:	72 St.:	168 St.:	192 St.:
1+2	0,005 ml	1 : 1	24 St.	83,0	35,0	8,3	1,0
1+3	0,005 ml	1 : 1	24 St.	71,5	33,3	18,3	0,0
2+3	0,005 ml	1 : 1	24 St.	75,0	28,1	20,8	1,32
1+2+3	0,005 ml	1 : 1 : 1	24 St.	52,2	25,0	10,3	2,0

Aus diesen Zahlen wird einwandfrei klar, daß eine einfache Verbindung der 3 Symbiosestäme nicht einmal nach 7 Tagen dem natürlichen Vorbild entspricht, was wohl darauf zurückzuführen ist, daß auch diese 3 Stämme unter gleichen Bedingungen nicht rein symbiotisch auf einander reagieren. In der Natur stufen sie sich also ab.

## II.

### Wiedervereinigung der Stämme unter Verwendung verschiedener Inokulumengen.

## A XII

Bezeichnung der Stämme	Verhältnis d. Inok. Mengen in ml.	Alter d. Kultur	Wieviel % Rest-Glukose blieb übrig:				
			48 St.:	72 St.:	7 d. 168 St.:	8 d. 192 St.:	
1+2	1 : 1	24 St.	83,0	35,0	8,3	1,0	
1+2	0,25 : 1	24 St.	42,2	10,0	0,0	1,0	
1+2	1 : 0,25	24 St.	40,0	—	9,3	1,0	
1+2	0,5 : 1	24 St.	—	—	6,65	1,32	
1+3	1 : 1	24 St.	71,5	33,3	18,3	0,0	
1+3	0,25 : 1	24 St.	51,5	26,6	26,6	1,0	
1+3	1 : 0,25	24 St.	55,0	19,9	18,3	13,6	
1+3	0,5 : 0,25	24 St.	—	—	25,0	1,02	
2+3	1 : 1	24 St.	75,0	28,1	20,8	1,32	
2+3	0,5 : 1	24 St.	73,0	36,6	18,3	4,76	
2+3	0,5 : 0,25	24 St.	43,2	26,6	14,—	1,0	
2+3	1 : 0,25	24 St.	—	—	16,6	9,3	
1+2+3	1 : 1 : 1	24 St.	58,2	25,0	10,3	2,0	
1+2+3	0,25 : 0,5 : 1	24 St.	40,0	30,25	13,—	1,—	
1+2+3	1 : 0,5 : 0,25	24 St.	30,0	15,0	15,0	1,0	
1+2+3	0,5 : 1 : 0,25	24 St.	—	—	16,6	12,3	
natürl. Symb.	0 St.:	24 St.:	48 St.:	72 St.:	96 St.:	120 St.:	144 St.:
	93,6	48,3	17,9	12,4	12,65	5,95	13,8

Vergleichen wir die Zusammensetzungen der Stämme 1,2 und 3 bei verschiedenen Inokulummengen, fällt uns die Gruppe 1 + 2 als besonders günstig auf; schwächer sind die Zusammensetzungen 1 + 3 und ganz zweifellos am wenigsten günstig ist 2 + 3. Allgemein folgt daraus, daß Stamm 1 (*A. suboxydans*) oxydoreduktiv am stärksten ist und von Stamm 2 (*A. melanogenum*) gefördert, von Stamm 3 (*A. xylinoides*) aber gehemmt wird. Stamm 2 wird von Stamm 3 noch stärker gehemmt. Dies geht auch aus den Mengenverhältnissen hervor: 1+2 im Verhältnis 1:1 ist etwas schlechter als die Ursymbiose, im Verhältnis 2:1 ist diese Zusammensetzung schlechter, als im Verhältnis 1:2. Die Gärkurve dieser Zusammensetzung kommt der Gärkurve der Ursymbiose am nächsten. In der Gesamtzusammensetzung kommen alle 3 Stämme am besten weg, wenn es sich um das Verhältnis 3:2:1 (1:0.5:0.25) handelt, aber auch 1+2+3 im Verhältnis 1:1:1 erscheint noch gut.

Abschließend lässt sich orientierend sagen: Stamm 1 ist auf D-Glucose stark oxydoreduktiv, Stamm 2 verstärkt, Stamm 3 hemmt diese seine Tätigkeit, noch mehr hemmt Stamm 3 als Stamm 2. Vereinigen wir 1+2, kommen wir bei gleichen Inokulummengen der Ursymbiose nahe, noch näher bei Inokulummengen 1:2. Vereinigen wir alle 3 Stämme, spielt es keine allzu grosse Rolle, wenn wir sie in gleichen Inokulummengen ansetzen, oder im Verhältnis 3:2:1. Diese sind aber ein wenig besser. In keinem Falle jedoch wird die Ursymbiose ganz erreicht.

### III.

#### Resynthese unter Veränderung des Zeitfaktors.

Da uns die Ergebnisse, die wir unter I. und II. mitteilten, nicht genügten, versuchten wir die Stämme unter sonst gleichen Bedingungen (Inokulummenge 0,5 ml einer 24 Stunden alten, flüssigen Kultur) in Zeitintervallen nach einander dem Gärsubstrat zuzusetzen. Diese Zeitintervalle betragen 18, 24, 48 und 72 Stunden. Die verwendeten Stammkombinationen waren:

- I: 1+2
- II: 1+3
- III: 2+3
- IV: 1+2+3.

Es ergaben sich folgende Zahlen:

A XIII. (Zeit : 18 St.—B, 24 St.—C, 48 St.—D, 72 St.—E)

Zusammenstzg. der Stämme	Zeitnerv. des Zusetzs	Kultur plus Zeit	Wieviel % Restglukose blieb übrig nach:						
			24 St.:	48 St.:	72 St.:	96 St.:	120 St.:	144 St.:	
I. (1+2)	18	I-B	98,0	92,0	88,6	49,8	30,0	16,7	
"	24	I-C	85,0	81,5	78,0	63,0	20,5	11,3	
"	48	I-D	—	69,75	—	45,0	—	23,3	
"	72 St.	I-E	—	—	50,5	—	—	33,3	
II. (1+3)	18	II-B	97,5	94,8	92,0	51,5	28,3	23,3	
"	24	II-C	86,5	80,0	75,0	50,5	16,7	6,65	
"	48	II-D	—	50,75	—	46,5	—	26,7	
"	72 St.	II-E	—	—	55,0	—	—	28,3	
III. (2+3)	18	III-B	96,5	92,0	90,0	50,5	30,0	16,0	
"	24	III-C	84,0	78,8	73,0	41,6	29,2	6,65	
"	48	III-D	—	53,3	—	43,3	—	28,3	
"	72 St.	III-E	—	—	59,8	—	—	48,3	
IV. (1+2+3)	18 St.	IV-B (96,5)	86,5	86,5	75,0	42,5	6,0	13,0	
"	24	IV-C	78,0	75,0	75,0	40,0	28,3	16,0	
"	48	IV-D	—	46,5	—	39,2	—	25,4	
"	72 St.	IV-E	—	—	58,3	—	—	48,3	
Ursymbiose	—	0 St.:	24 St.:	48 St.:	72 St.:	96 St.:	120 St.:	144 St.:	
			93,6	48,3	17,9	12,4	12,65	5,95	13,8

Das Ergebnis dieser Versuchsreihe zeigt bei aller Anerkennung der bisher erprobten Kombinationen 1+2 (gleiche Volumina), 1+2 (0,25:1) und 1+2+3 (gleiche Volumina) wie 1+2+3 (1:0,5:0,25) die der Ursymbiose wohl nahe kommen, aber sie nicht erreichen, ein besseres und klarer einleuchtendes Resultat: Vereinigen wir die Symbionten 1, 2 und 3 jeweils nach 18 Stunden, ist die Gärkurve anfangs wohl schleppender, als die der Natursymbiose, was begreiflich ist, weil 3 fehlt, aber schon nach dem Zusatz (54 Stunden) zeigt sich die Besserung, die nach 120 Stunden die Natur erreicht. Nach 5 Tagen zeigt die Ursymbiose 5,95 und das Modell 6,0 % Restglukose. Dieses Resultat ist nicht zufällig, sondern hält an, nach 6 Tagen stehen 13,8 % Ca-2-keto-D-glukonat der Natur gegen 13,0 % des Modells.

Dieses Ergebnis öffnet den Weg einer weiter entwicklungsfähigen Methodik und wir dürfen resumieren:

#### Übersicht:

1. Die natürliche Symbiose vergärt stationär: 94,05 % D-Glukose in 5 Tagen,  
ihre einzelnen Glieder im Durchschnitt 73,23 % D-Glukose in 5 Tagen,
2. Die Verbindung dieser Glieder in gleichem Alter ergab: 89,7 % D-Glukose in 7 Tagen,
3. Die Verbindung dieser Glieder in verschiedenen Inokulummengen:  
0,25:0,50:1,00 ergab 87,0 % D-Glukose in 7 Tagen,  
1,00:0,25:0,50 ergab 85,0 % D-Glukose in 7 Tagen,  
0,50:1,00:0,25 ergab 83,4 % D-Glukose in 7 Tagen,

4. Die Verbindung dieser Glieder  
in gleichen Inokulummengen nach  
jeweils 18 Stunden

94,0 % D-Glukose in 5 Tagen.

#### IV.

### DISKUSSION

Es ist durchaus notwendig und begreiflich, daß sich die Mikroorganismen in der Natur nicht wahllos verteilt finden, sondern daß bestimmte Fundorte gemäß der dort vorhandenen, angebotenen Nährstoffe (C-quellen, N-substanzen und bestimmte Wuchsstoffe vor allem) bestimmten Mikroorganismengruppen eine Entwicklungsmöglichkeit bieten, für die sich die dort befindliche Nährstoffkomposition besonders eignet. So sind es die Essigbakterien, die in luftfaulen Äpfeln das Feld der ersten Phase beherrschen. Zweifel, die vom chemischen Standpunkte aus geäußert werden können, ob dies auch immer so sei, können jedesmal durch drei Tests wiederlegt werden. Einmal durch die oekologische Analyse symbiotischer Abimpfungen, die bei herbstfaulen Äpfeln überwiegend Essigbakterien, vor allem *A. suboxydans*, *A. melanogenum*, *A. xylinum*, *A. xylinoides* und *A. aceti* ergaben und mit dieser oekologischen Analyse zusammen die Verfolgung des Absinkens der Reduktionskurve bis zum Nullwert (die Bildung von Ca-D-glukonat) sowie ihres Wiederanstiegens (Bildung von Ca-2-keto-D-glukonat) respektive die in Grob- und Feingewicht erfaßte Bildung von Ca-5-keto-D-glukonatkristallen. Drittens ist in größeren Gäransätzen die Kontrolle mittels Chromatographie (Papier- und Säulenchr.) und die Darstellung der Metabolisate in Grammen und Prozenten wünschenswert und notwendig.

Da wir es — aus Orientierungsgründen — mit riesenhaften Reihenversuchen zu tun hatten, beschränkten wir uns auf die Verfolgung der Reduktionskurve der Glukosevergärung nach 24, 48, 72, 96, 120 und 144 Stunden (wo durch den Versuch begründet fallweise mit noch größeren Zeiteilen) weiters auf die gewichts- und prozentmäßige Ergründung der 5-ketoglukonatbildung und auf oekologisch-mikrobiologische Analyse.

Die Feststellung, daß in der ersten Gärphase herbstfauler Äpfel Essigbakterien das Feld halten und Hefen (*Saccharomyces*- und *Torula*arten) erst etwa eine Woche später in größeren Mengen auftauchen und ganz zum Schluß erst die Schimmelpilze, verdanken wir dem methodischen Schritte, aus angesetzten Gärkulturen nach 24, 38, 72 und 96 Stunden Schrägagarröhrchen anzulegen und diese ebenfalls nach 24, 48, 72 und 96 Stunden jeweils einer oekologischen Analyse zu unterwerfen. Wir konnten diese Versuche oft genug wiederholen.

Aus der Reihe außerordentlich vieler Versuche an verschiedensten faulen Früchte haben wir diese Arbeit unsere Versuche an braunfaulen Äpfeln ausgesucht. Der Grund für diese Wahl liegt vor allem bei herbstfaulen Äpfeln in der großen Stabilität und Regelmäßigkeit der Zusammensetzung ihrer Mikroflora unter Voraussetzung der Anwendung unserer Methodik und Technik. Über den Vorgang haben wir in der Arbeit berichtet und eine abgekürzte Übersicht der Methodik bieten

die Tafeln A II. und A III. Die von uns ausgenutzte Reproduzierfähigkeit solcher abgeimpften Symbiosen wird durch den Vergleich des Versuches Okt. 1952 (I. Passage) und seiner aus einfachen Konserven<sup>9)</sup> wieder „belebten“ II. Passage im April 1953 hervor, der mit kleinen Veränderungen ähnliche Resultate zeigte (siehe Tafeln A IV und A V).

Daß die Versuche an frühjahrsfaulen (kastenfaulen) Äpfeln im Gegensatz zu herbstfaulen andere, viel schlechtere, ja nahezu negative Ergebnisse zeigten, taten wir am Vergleiche zweier Versuche A VI. (Heřmanic, Herbst 1953) und A VII (Heřmanic, Frühjahr 1955) dar. Aus dem oekologischen Vergleich ist zu sehen, daß der Herbstflor (Überwiegen bis Ausschließlichkeit der Essigbakterien) einem Frühjahrsflor gewichen ist, der weit uneinheitlicher und für uns industriell nicht interessant genug ist (Schleimbildner, Sarcinen, Micrococcen, gramneg. Stäbchen).

Sodann untersuchten wir die Wirksamkeit einiger Symbiosen nicht nur im Ganzen, sondern auch jedes einzelne ihrer Mitglieder gesondert. Wir nannten diesen Teil unserer Methodik Analyse des Glukosemetabolismus.

Diese Analysen hatten genug überraschende Resultate. Die untersuchten Symbiosen vergären als Ganzes die D-Glukose wesentlich rascher, als die einzelnen Stämme. (Die Reduktionskurve der Restglukose sinkt bis beinahe zum Nullwert herab und steigt dann wieder an, es bilden sich zuerst Ca-D-glukonat und dann Ca-2-keto-D-glukonat, gleichzeitig bilden sich meist Ca-5-keto-D-kristalle.

1. Auf Grund dieser Ergebnisse schritten wir zur Resynthese einer dieser in flüssige Subkulturen abgeimpften Symbiosen. Wir gliederten die Arbeit in drei Phasen: 1. permutierten wir die genau definierten Stämme 1, 2 und 3 [*A. suboxydans*, *A. melanogenum* und *A. xylinoides* der Symbiose Nr. 19 des Versuches Oktober 1952 in bezug auf die Stammzusammensetzung, also 1+2, 1+3, 2+3 und 1+2+3. Es ergab sich, daß Stamm 1. *A. suboxydans*] ein stark glukose-oxydoreduktiver Stamm ist, daß ihn Stamm 2 (*A. melanogenum*) in dieser Eigenschaft unterstützt, Stamm 3 (*A. xylinoides*) aber hemmt. Die schlechtesten Erfolge ergaben 2+3, die besten 1+2+3. Keiner dieser Versuche aber erreichte die Ursymbiose der Natur, wohl schon deswegen, weil diese drei Stämme in der Natur in Wuchs und Vermehrungsfaktor nicht gleichgestellt sind, wir aber sie in je gleich großer minutüöser Menge einer Impföse (0,005 ml) vereinigten.

2. permutierten wir die gleichen Stämme in verschiedenen Inokulum-mengen von je  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$  und 1 ml Inokulum. Hier ergaben sich die gleichen gegenseitigen Verhältnisse der Stämme 1, 2 und 3. 1+2 waren jedoch im Verhältnis der Inokulum-volumina  $\frac{1}{4}$  zu 1 und 1+2+3 im Verhältnis 1: $\frac{1}{2}$ : $\frac{1}{4}$  besser als die Zusammensetzungen 1:1 und 1:1:1 und kamen auch den Verhältnissen der Ursymbiose der Natur näher, ohne sie allerdings zu erreichen.

3. Auf Grund dieser Erkenntnis führten wir anstelle verschiedener

<sup>9)</sup> Hier bewährte sich die Methode, Schrägagarröhrchen mit der abgeimpften Symbiose lufttrocken und steril aufzubewahren.

<sup>10)</sup> Symbiose Nr. 19 ist identisch mit der Symbiose Nr. 16 aus Versuch Okt. 1952. Die Änderung der Bezeichnung ergibt sich aus der Passagierung. Siehe auch <sup>3)</sup> und <sup>6)</sup>.

Inokulummengen verschiedene Zeitintervalle als Untersuchungsfaktor ein (18, 24, 48, 72 Stunden). Wir gingen hier von der bisher erlangten Wertung der Stämme aus und erwarteten, daß diese in verschiedenen Zeitintervallen Gelegenheit bekommen würden die natürliche Stärke zu erlangen. So konnten sie im gegebenen Kampfe ums Dasein ihr Feld behaupten. (Deswegen sahen wir auch davon ab, diese Untersuchungsform mit der Untersuchungsform 2 zu kombinieren.)

Das Ergebnis war durchaus positiv. Bei der Verwendung von 18stündigen Intervallen zwischen der Inokulation von 1, 2 und 3 erzielten wir eine im Anfang begreiflicherweise noch schleppend metabolisierende, da unvollständige Symbiose, die sofort nach Zusatz von Stamm 3 ihr Gesicht veränderte und rasch das natürliche Vorbild (nach 120 Stunden) erreichte und nun nur noch eine Differenz von 0,05 % aufweist. Diesen Standard hielt sie auch nach 144 Stunden bei der nun erfolgenden Bildung von Ca-2-keto-D-glukonat (Diff. 0,8):

Wir wiederholen die erreichten Zahlen:

Bezeichnung:	0 St.:	24 St.:	48 St.:	72 St.:	96 St.:	120 St.:	144 St.:
natürliche Symb:	93,6	48,3	17,9	12,4	12,65	5,95	13,8
resynthet. Symb:	96,5	86,5	86,5	75,0	42,5	6,00	13,00

Wir haben von vorne herein mit Anfangsunvollkommenheiten gerechnet und sind uns auch einer gewissen Grobschlächtigkeit dieser Art von Selektion bewußt; andererseits müssen wir aber betonen, daß wir uns einen anderen Weg kaum vorstellen können, aus dem Überreichtum der Natur in die gebotene Schmalheit eines Versuchsfeldes zu münden. Die Methodik in flüssigen Subkulturen auf 4 Standardböden und Subagaren nach 24, 48, 72, 96, 120 und 144 Stunden Sym- und Metabionten abzufanden, hat sich bewährt und bietet weitere Arbeitsmöglichkeiten, ebenso wie der Versuch, natürliche Mikroflorengruppen zu resynthetisieren und so Modelle für industrielle Gärvorgänge zu finden.

## V.

### ZUSAMMENFASSUNG

1. Wir selektierten aus reichem Materiale 10 markante Versuche in langen Reihen an Mikrofloren braunfauler Äpfel. Auf Grund dieser Versuche haben wir eine Methodik ausgearbeitet, die Sym- und Metabionten dieser Mikrobengesellschaften in Bezug auf Oekologie und Glukosemetabolismus zu analysieren.

2. Mikrobengesellschaften, im Herbst von einem Faulmaterial abgeimpft, das dem Zutritt der natürlichen Außenwelt zugänglich war, zeigten in Zahl und Gruppierung der Sym- und Metabionten, der Aktivität des Glukoseabbaus und der Bildung von Ca-D-glukonat, Ca-2-keto-D-glukonat und Ca-5-keto-D-glukonat eine reproduzierbare Regelmäßigkeit im Gegensatz zu frühjahrsfaulen Äpfeln aus abgeschlossenen Räumen. (Unregelmäßige Mikroflora, sehr geschwächter und verlangsamter Glukoseabbau).

3. Die Gäreigenschaften der Symbiose sind stärker, als die der Einzelglieder.

4. Einschlägige Faktoren, wie Permutation der einzelnen Stämme, Abstufung des Volumens der einzelnen Stamminokula und der Zeitintervalle zwischen den nacheinander erfolgenden Zusätzen der einzelnen Symbionten ermöglichten eine genauere Resynthese einer der untersuchten Symbiosen (Nr. 19, Oktober 1952, 0,05 % Fehlerbreite). Das Intervall der nacheinander zugesetzten Stämme 1, 2 und 3 beträgt 18 Stunden.

#### LITERATURVERZEICHNIS:

(1)

Doctor J. M., Couch J. R. (1954): An Unusual Example of Symbiosis of Bacteria (*L. leichmannii* und *Leuconostoc citrovorum*). — Arch. biochem. and biophys. 51, 530 ff.

(2)

Hargrove R. E., Leviton A. B. (1952): Microbial Synthesis of Vit. B. 12 by Propionic Acid Bacteria (*L. casei*, Prop. freundenreichii). — Ind. Eng. Chem. 44.

Nielsen N., Hartelius V. (1936): Cooperation of Aneurin and Beta-alanine in Combination with Asparagine and Glutamic Acid as Growth vor Yeast. — C. R. trav. Lab. Carlsberg sér. physiol 22, 375—386, zit. C. A. 33/9358-1.

Koch A. Offhaus C., Schwarz I. (1951): Der Mechanismus der Wirksamkeit des Vitamin-B-Komplexes auf das Vitamin T-p. — Naturwiss. 38, 331—345.

(3) Antagonismus:

Ruschmann G. (1951): Neue Forschungsergebnisse über Antibiotika und ihre Bergleitstoffe (Wuchs- und Wirkstoffe) — Pharmazie 6, 369—377.

Wallenfels K. (1945): Symbiose und Antibiose. — Die Chemie 58, 1—16.

Opieńska-Blouth, J. (1948): Growth Factors for Microorganisms and their Antagonists. — Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska Lublin, Polen, Sect. D. 3, Nr. 1, 1—42. zit. C. A. 44/10808-e.

Ramon G., Richou R. (1948) Some New Facts about Microbial Antagonists. I. Antidotic Properties of Culture Filtrate of *Bacillus subtilis* and *Penicillium notatum*. — Scientit (Ital.). 83, 64—67. zit. C. A. 42/7825-b.

Höring F. O. (1953): Symbiose und Antibiose. — Deutsch. mediz. Wschr. 4, 9—12, 240 bis 243.

(4) Leguminosen-Knöllchenbakterien:

Stutzer J. M. (1895): Neuere Arbeiten über die Knöllchenbakterien der Leguminosen und Fixierung des freien Stickstoffes durch die Tätigkeit der Mikroorganismen. — Cbl. Bakt. 1 (2) 68 ff.

Salfeld (1895): Vernichtung der Leguminosenpilze durch Ätzkalk. — Cbl. Bakt. 1 (2) 708 ff.

Wilfarth. (1895): Die Rolle der Bakterien in der Landwirtschaft. — Cbl. Bakt. 1 (2) 291 ff.

Hiltner L. (1900): Über die Bakteroiden der Leguminosenknöllchen und ihre willkürliche Erzeugung außerhalb der Wirtspflanze. — Cbl. Bakt. 6 (2), 273 ff.

Smith R. G. (1900): Nodule Organism of the Leguminosae. — Cbl. Bakt. 6 (2) 299 ff.

Demolon A., Dunez A. (1938) Agronomic Observations on the Bacterial Symbiosis. — C. R. 206, 703—711. zit. C. A. 32/4195-4.

Schauderl E. (1939): Bakterielle Symbiosen mit Leguminosen und Nichtleguminosen. — Gartenbauwiss. 13, 406—440.

Hennig K., Villforth F. (1940): Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Bakteriensymbiose in höheren Pflanzen und ihrer Beeinflussung durch Zist. elemente. — Biochem. Zschr. 305, 299—309.

Winogradskij S. et Hël. (1941): Legume Nodules as Producers of Ammonia. — C. R. 213, 713—717. zit. C. A. 37/2778-3.

- Schaede R. (1943): Die pflanzlichen Symbiosen. — Jena, Fischer, — Naturwiss. 31, 279 ff.
- Demolon A., Dunez A. (1943): The Mechanism. of Bacterial Symbiosis with Leguminous Plants. — C. r. 216, 312—313. zit. C. A. 38/2696-7.
- Wilson J. K., Chi Han Chu. (1947): Symbiotic Studies with Isolates from Nodules of Species of Astragalus. — Soil. Sci. 63, 119—127.
- Bud G. (1951): Symbioses of Leguminous Plant and Nodule Bacteria. IV. The Importance of the Oxygen Factor in Nodule Formation. — Ann. Bot. 15, 95—108.
- (5) Virus-Bakterien:
- L. A. Zil'ber (1952): Uspekhi Sovremennoj Biol. 33. 81—100, USSR.
- (6) Bodensymbiosen:
- Burri R., Stutzer J. M. (1896): Zur Frage der Nitrifikation des Erdbodens. — Cbl. Bakt. 2 (2) 105 ff.
- Winogradskij S. (1896): Zur Mikrobiologie des Nitrifikationsprozesses. — Cbl. Bakt. 2 (2) 415—419.
- Reinke J. (1905): Symbiose von Volvox und Azotobacter. — Cbl. Bakt. 11 (2) 712 ff.
- Vartiovaara U. (1938): The Symbiotic Growth of Cellulose decomposing Fungi and Nitrogen Fixing Bacteria (Azotobacter chroococcum, Cl. pasteurianum). — Maataloustieteellinen Ajkakanskirja 10, 241—261. Zit. C. A. 34/7324-9.
- Imšene'ckij A. A., Bayarskaja B. G. (1938): Mikrobiologija 8, 657—662.
- Gudersen K. (1954): Nitrification of Soil: a Symbiotic Phenomenon. (Nitrosomonas hilft die Giftigkeit der organischen Materie für die nitrif. Bakterien überwinden). — Congr. Internat. Botan. Paris. R. et Agr. Sect. 21—27, 15—16. zit. C. A. 48/10971-a.
- Mycorrhiza:
- Hiltner L. (1904): Beiträge zur Mycorrhizafrage. — Cbl. Bakt. 10 (2) 479 ff.
- Neger F. W. (1905): Ein Beitrag zur Mycorrhizafrage (Kampf um die Nährsalze). — Cbl. Bakt 11 (2) 510 ff.
- (7)
- Vintika J. (1953): Příspěvek ke studiu symbios azotobaktera. — Čs. biol. 2 (2) 93—96.
- (8) Intestinale Symbiosen:
- Jeumiaux Charles (1954): Chitinase and the Intestinal Bact. Flora of Gastropods (Chitinase, chitinolytische Bakterien von Helix pomona) — Acad Roy. Belg. Classe Sci/28, 7, 5—45. zit. C. A. 48/9568-a.
- Dias C. Jimenez, Ales A. J. Vivonto F. (1953): Symbiotic Activity of Intestinal Microbial Flora. — Rev. chim. Españ. 51, 294—305. zit. C. A. 48/7133-e.
- Diaz C. Jimenez, Ales A. J. Vivonto F. (1953): Symbiotic Action of Intestinal Microbial Flora. — Bul. Inst. Med. Research Univ. Madrid 6, 105—128. zit. C. A. 48/12950-g.
- (9) Essigbakterien als Kontaminanten:
- Walker T. K. (1949): Acetic Acid Bacteria as Contaminants in the Ferment. Industrie. — Rev. Proc. 4 the Internat. Congr. Microbiol. 1947, 547—9.
- Silvestre Ant. Mel. (1944): New Aspects of the Problem of Desinfection. — Noticias farm. (Portugal) 8, 179—93.
- (10) Floren versch. Vorkommen:
- Magrou J. (1941): The Biology of Potato (Mycorrhiza-Fungi). — Ann. Inst. Past. 66, 249—83. zit. C. A. 37/5533-4.
- Behrens J. (1896): Die Beziehungen der Mikroorganismen zu Tabakbau und Tabakfabrikation. — Cbl. Bakt. 2 (2) 514—40.
- Jegunov (1896): Bakteriengesellschaften. — Cbl. Bakt. 2 (2) 11, 441, 478, 739 ff.
- Ludwig F. (1896): Die Genossenschaft der Baumflußorganismen. — Cbl. Bakt. 2 (2) 337—349.
- Weinzierl J. (1900): The Bacterial Flora of the American Cheddar Cheese. — Cbl. Bakt 6 (2) 785 ff.
- Wehmer C. (1897): Beitrag zur Kenntnis der Häringslake. — Cbl. Bakt. 2 (2) 209 ff.
- Burri R. (1904): Die Bakterienvegetation auf der Oberfläche normal entwickelter Pflanzen. — Cbl. Bakt. 10 (2) 756 ff.

(11) Obstsymbiosen:

- Wehmer C. (1896): Untersuchung über die Fäulnis von Früchten. — Beiträge zur Erk. einheim. Pilze. Jena, Fischer 1895. — Cbl. Bakt. 2 (2) 241 ff.
- Behrens J. (1897): Beiträge zur Kenntnis der Obstfäulnis (*Monilia fructigena*). — Cbl. Bakt. 3 (2) 514 ff.
- Wehmer C. (1899): *Monilia fructigena* und die Monilienkrankheit der Obstbäume. — Cbl. Bakt. 5 (2) 607 s..
- Rick J. (1901): Eine neue *Sclerotinia*-art. — Cbl. Bakt. 7 (2) 699 ff.
- Smith R. E. (1901): *Botrytis* and *Sclerotinia*, their Relations to Certain Plant Diseases. — Cbl. Bakt. 7 (2) 469 ff.
- Taschenberg L. E. (1901): Schutz der Obstbäume gegen feindliche Tiere. — Cbl. Bakt. 7 (2) 476 ff.
- Aderhold R. (1907): Über eine vermutlich zu *Monilia fructigena* Persoon gehörige *Sclerotinia*. — Cbl. Bakt. 13 (2) 465 ff.
- Osterwalder A. (1907): Über eine bisher unbekannte Art der Kernobstfäule, verursacht durch *Fusarium putrefaciens*, nova species. — Cbl. Bakt. 13 (2) 207—230.

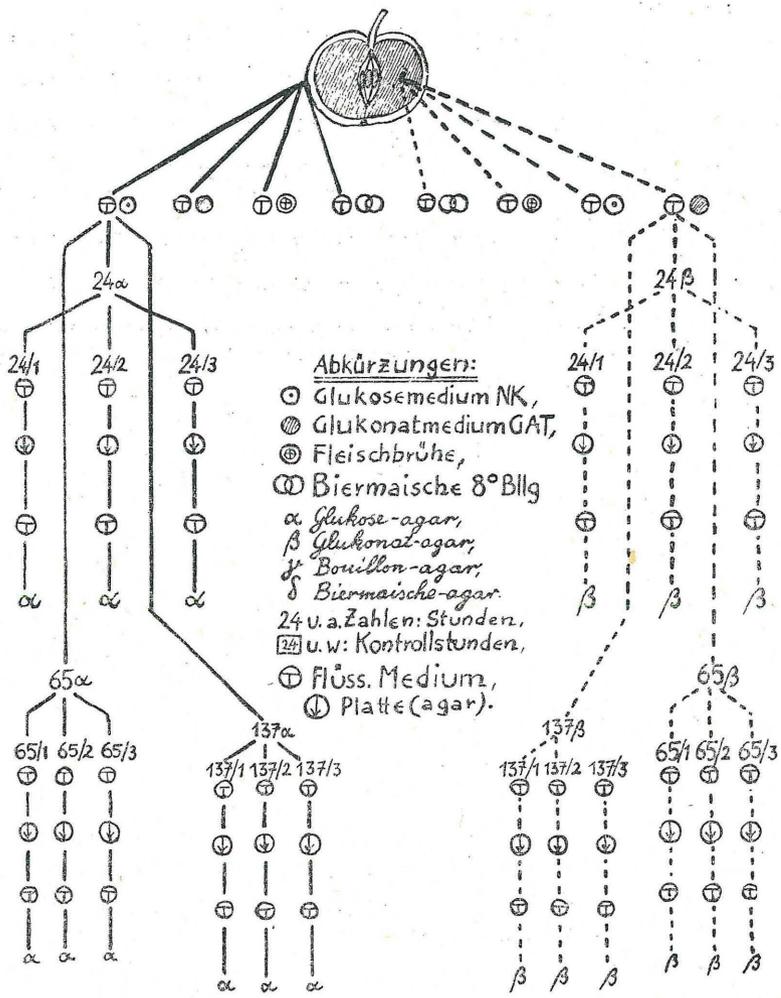


Fig. A II.

**Methodik der Anlage flüssiger und fester Subkulturen von der Cuticula und aus dem Inneren des Faulapfels.**

Von jeder Frucht wählten wir als Impfstellen die Oberfläche (Cuticula) und das Innere (resp. den Saft). Jeder Versuch hat somit gemäß der 4 Standardböden 8 Ausgangspunkte (siehe Tafel). Die praktisch erreichbaren Zeitintervalle sind hier 24, 65 und 137 Stunden; nach diesen Intervallen legten wir aus allen Kulturen jeweils Schrägagarabstriche an.

Aus diesen Schrägagarröhrchen entstanden wieder flüssige Subkulturen, von denen wir Petrischalenplatten (Agar) anlegten. Erst von diesen Platten isolierten wir die Sym- und Metabionten und züchteten sie in flüssigen Subkulturen weiter. Daraus entstanden dann letztwillig Schrägagarröhrchen.

So erhielten wir aus einem Versuche 72 Symbiosen verschiedenen Alters auf verschiedenen Substraten.

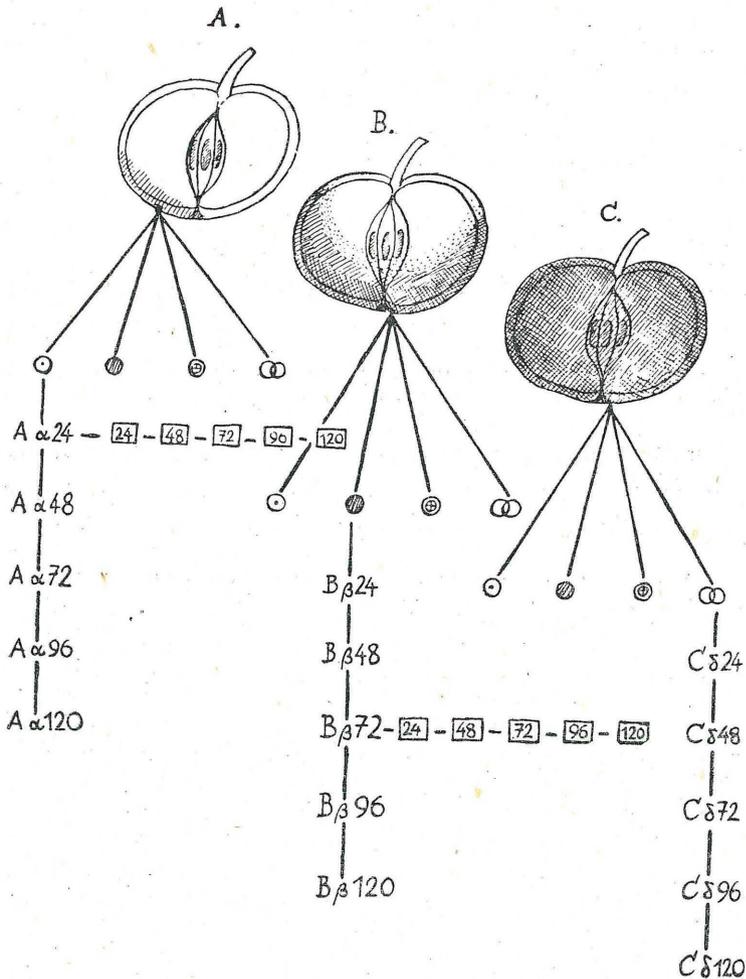


Fig. A III.

Ein Überblick der Animpfetechnik dreier Fäulnisstadien einer Frucht (A, B, C).

In Tafel A III ist das Beispiel einer Oberflächen(cuticular)-abimpfung ausgeführt.

Im Bilde sind die Cuticularimpfungen eines angefaulten Apfels (A) eines halbfaulten (B) und einer ganz verfaulten Frucht (C) als Beispiele gewählt. Jede Impfung wird in vier Subkulturen auf den 4 (flüssigen) Standartböden durchgeführt. Von jeder Subkultur werden nach je 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden Schrägagarrabstriche gemacht.

Von jedem dieser Schrägagarröhrchen werden nach Intervallen von 24, 48, 72, 96, und 120 Stunden flüssige Subkulturen gleichen Bodens angelegt und erst aus ihnen nach 24—48 Stunden Wuchses Agarplatten gleichen Bodens, von denen wir dann die Kolonien der einzelnen Mikrobenarten oder Stämme isolierten.