

ENCYCLOPAEDIA CINEMATOGRAFICA

Editor: G. WOLF

E 327/1960

Bacillus anthracis
Morphologie und Verhalten
bei verschiedenen Kulturbedingungen

GÖTTINGEN 1973

INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM

Film E 327

Bacillus anthracis
Morphologie und Verhalten
bei verschiedenen Kulturbedingungen

W. MÜNKER, Gießen

Begleitveröffentlichung von W. SCHARMANN, Gießen

Allgemeine Vorbemerkungen¹

Vorkommen und Bedeutung von Bacillus anthracis

Bacillus anthracis, der Milzbrandbazillus, ist ein grampositives Stäbchenbakterium mit einer Länge von 3—10 μm und einem Durchmesser von 1—1,5 μm . Während die Bazillen im Tierkörper einzeln oder in kurzen Ketten angetroffen werden, bilden sie auf künstlichen Nährböden lange Ketten und beginnen am Ende der logarithmischen Wachstumsphase zu versporen. Milzbrandbazillen aus tierischem Untersuchungsmaterial lassen besonders gut die Polypeptidkapsel erkennen, die die Bakterien umgibt und ihnen einen erhöhten Schutz vor Phagozytose verleiht.

Empfänglich für eine Infektion durch *B. anthracis* sind praktisch alle warmblütigen Lebewesen, vor allem Pflanzenfresser wie Rind, Schaf, Ziege, Pferd, Kaninchen, Meerschweinchen und Maus. In den gemäßigten Zonen tritt die Krankheit heute nur noch sporadisch auf, verursacht jedoch in den tropischen und subtropischen Gebieten noch erhebliche wirtschaftliche Verluste. Die Ursache hierfür ist nicht nur auf die geringere Seuchenprophylaxe in den Tropen zurückzuführen, sondern beruht vor allem auf den dort für die Vermehrung der Keime besonders günstigen Umweltbedingungen. Die im Erdboden persistierenden Bak-

¹ Angaben zum Film und kurzgefaßter Filminhalt (deutsch, englisch, französisch) s. S. 9 u. 10.

teriensporen benötigen für ihre Auskeimung eine relative Feuchtigkeit von über 80% und eine Temperatur von 20—44° C. Nur unter ähnlichen Voraussetzungen ist auch eine schnelle Sporulation — Bedingung für die Erhaltung der Art — möglich, da die vegetative Form gegenüber äußeren Einflüssen (Licht, Austrocknung, „konkurrierende Keimflora“) sehr empfindlich ist und rasch zugrunde geht.

Bei dem Import von Fellen und Häuten gelangen Milzbrandsporen auch nach Mitteleuropa und können aus den Abwässern der weiterverarbeitenden Industrie auf Weiden geschwemmt und so von Rindern und Schafen aufgenommen werden. Bisher ist nicht bekannt, wie durch das Verzehren der Sporen die Infektion ausgelöst wird — wahrscheinlich sind hierfür Läsionen in der pharyngealen oder intestinalen Mucosa Vorbedingung.

Die Milzbranderreger führen bei den Pflanzenfressern zur Septikämie, die innerhalb von 1—2 Tagen tödlich endet. Nach dem Tode der Tiere tritt schwärzlich-blutige Flüssigkeit aus den Körperhöhlen (daher der Name *B. anthracis*; anthrax (griech.) = Kohle), die nur die vegetativen Formen der Bazillen enthält. Erst außerhalb des Tierkörpers, bei Anwesenheit von genügend Sauerstoff, erfolgt die Sporulation.

Menschen können sich infizieren, indem sie sporenhaltigen Staub einatmen oder Sporen in die verletzte Haut einreiben, z. B. mit sporenbefallenen Fingern. Hautmilzbrand äußert sich in eitrigen Geschwüren („Milzbrandkarbunkel“) und ist prognostisch günstig zu beurteilen. Dagegen endet Lungenmilzbrand trotz Empfindlichkeit der Keime gegen die meisten Antibiotika auch heute noch meist fatal, da die Keime von der Lunge aus rasch in die Blutbahn eindringen und Toxine freisetzen.

Sporen

Sporen sind die gegenüber äußeren Einflüssen (Hitze, Austrocknung, ionisierende Strahlen, Desinfektionsmittel) widerstandsfähigsten lebenden Organismen, die wir kennen. Milzbrandsporen werden in kochendem Wasser erst nach 12 Minuten abgetötet und bleiben in Alkohol voll virulent. Auf trockenen Weiden können Milzbrandsporen jahrelang persistieren. Schon Pasteur zeigte, daß die Sporen von vergrabenen, an Milzbrand eingegangenen Tieren nach 12 Jahren noch voll lebensfähig waren.

Die Zelle befindet sich als Spore im Zustand der „Kryptobiose“, d. h. ihr Stoffwechsel ruht. Auf diese Weise vermag sie ungünstige Lebensbedingungen zu überdauern, bis wieder ein für die vegetative Form günstiges Milieu eintritt. Dennoch ist die Versporung kein Vorgang, der nur bei Nährstoffmangel o. ä. eintritt, sondern ein normales Ereignis im Wachstumszyklus der Bazillen, das regelmäßig einige Stunden nach Beendigung der logarithmischen Wachstumsphase erfolgt. Die

biologische Bedeutung der Sporulation ist deshalb nicht eindeutig zu erklären. Möglicherweise handelt es sich um ein Relikt aus der Frühzeit der Bakterien, in der die Sporenbildung eine Voraussetzung für die Erhaltung der Art war. Auch die hohe Widerstandsfähigkeit der Sporen gegenüber äußeren Einflüssen läßt sich nur teilweise deuten. Die Undurchlässigkeit des dichten Sporenmantels erklärt ihre Unempfindlichkeit gegen Desinfektionsmittel und Austrocknung. Die Hitzeresistenz läßt sich vielleicht auf den extrem niedrigen Wassergehalt der Sporen und den hohen Anteil der Sporenwand an Calcium-Dipicolinat zurückführen.

Sporulation

Im Lichtmikroskop ist als erstes Anzeichen der Versporung eine leichte Verdichtung in einem Teil der Zelle zu erkennen: die Vorspore. Aus diesem Bezirk entwickelt sich im Verlauf von etwa 5—6 Stunden die reife Spore und wird dann aus den Resten der vegetativen Zelle freigesetzt. In einer gut versporenden Kultur bilden fast alle Zellen eine Spore.

Genaueren Aufschluß über die einzelnen Phasen der Sporenbildung haben erst elektronenmikroskopische Studien erbracht. Danach bildet sich zunächst an einem Ende der Bakterienzelle eine Verdichtung (Nucleus), die vor allem genetisches Material und einen kleinen Teil des Plasmas enthält. Gleichzeitig stülpt sich die zytoplasmatische Membran (innere Zellmembran) nach dem Zellinnern hin aus und bildet zwischen Nucleus und der übrigen Zelle ein Septum. Indem das Septum weiter um den Nucleus herumwächst, trennt es die sich bildende Spore von der Mutterzelle. Die Vorspore wird auf diese Weise von einer separaten doppelten Membran umschlossen, zwischen der sich im Verlauf der nun rasch erfolgenden Reifung noch weitere Schichten der Sporenhülle lamellenartig ausbilden: die innere Cortex und der sie umgebende Sporenmantel. Die Cortex enthält vor allem Mucopeptid. Der Sporenmantel besteht aus keratinartigem Protein, das der vegetativen Zelle fehlt und das die Undurchlässigkeit und Widerstandsfähigkeit der Sporenwand bedingt.

Auskeimung

Während die Sporulation mit der Synthese neuer, sporenspezifischer Enzyme, Antigene und Strukturen einhergeht, stellt die Auskeimung einen Abbauprozess dar. Die für die Auskeimung erforderlichen Enzyme sind in der Spore bereits vorhanden und müssen nur noch aktiviert werden.

Frisch gebildete Sporen sind auch unter günstigen Voraussetzungen zumeist nicht fähig, sogleich wieder auszukeimen, sondern bedürfen dazu erst der „Aktivierung“, die in der Regel durch den Alterungsprozess

erfolgt. Aber auch äußere Faktoren wie Erhitzen, saurer pH oder Oberflächenmazeration können die Aktivierung auslösen. Wenn die aktivierte Spore sich in einem für die Keimart günstigen Milieu (Nährstoffe, Atmosphäre, Temperatur, pH) befindet, keimt sie aus. Dieser Vorgang wird von dem Verlust fester Zellbestandteile (vor allem Calcium-Dipicolinat und Muraminsäure) und dem Brüchigwerden des Sporenmantels begleitet. Damit verliert die Spore ihre spezielle Resistenz gegenüber äußeren Einflüssen und wird anfärbbar (Sporen in der Ruhephase nehmen Farben nur nach Vorbehandlung mit Hitze oder Säure an). Der Sporenkern zeigt in dieser Phase der Auskeimung im elektronenmikroskopischen Bild bereits alle wichtigen Elemente der zukünftigen vegetativen Zelle. Mit dem Herauswachsen des Sporenkerns zur vegetativen Form — aus der inneren Membran entwickelt sich die neue Zellwand — wird der umgebende Sporenmantel gesprengt und das Längenwachstum der Zelle setzt ein.

Wirkung von Penicillin

Die äußere Zellwand der grampositiven Bakterien besteht zum größten Teil aus Murein, einem Netzwerk von Aminosuktern, die durch Polypeptide miteinander verknüpft sind. Beim Wachstum der Zellwand sind spezifische Enzyme (Mucopetidasen) eingeschaltet, welche die Zuckerketten und die Peptidverbindungen aufbrechen, damit neue Bausteine mit Hilfe von Transpeptidasen in die Zellwandstruktur eingefügt werden können. Man nimmt nun an, daß Penicillin die Transpeptidasen hemmt und somit das geöffnete Murein-Netz nicht mehr geschlossen werden kann. Das Zytoplasma, umgeben von der zytoplasmatischen Membran, wächst jedoch noch weiter, vergrößert die Lücken und quillt durch die Löcher in der Zellwand nach außen, bis schließlich bei gestörtem osmotischen Gleichgewicht Lysis erfolgt. Hieraus wird erklärlich, daß Penicillin nur auf wachsende Zellen wirkt und Bakterien im Ruhezustand unbeeinflusst läßt. Manche Bakterienarten wissen sich vor der Penicillinwirkung durch die Bildung eines Antagonisten — der Penicillinase — zu schützen. Dieses Enzym bricht den Lactamring des Penicillins auf und macht das Antibiotikum auf diese Weise unwirksam.

Filmbeschreibung¹

Bacillus anthracis mit Kapsel; Blut-Tusche-Präparat

24 B/s

Die Kapsel von *B. anthracis* wird vor allem im Tierkörper gebildet und läßt sich mit Hilfe von Tusche-Präparaten besonders gut darstellen.

¹ Die *Kursiv*-Überschriften entsprechen den Zwischentiteln im Film.

Da die Rußpartikelchen der Tusche nicht in die Kapselsubstanz eindringen können, heben sich die Konturen der Kapsel scharf von der Umgebung ab. In der Filmaufnahme sind die Bazillen von Erythrozyten und deren Zellschatten umgeben.

Sporen und ihre Auskeimung. Ruhende Sporen erscheinen hell, vor dem Auskeimen werden sie dunkel. Sporenhüllen platzen

2—4 B/Min.

Die ruhende Spore erscheint infolge des starken Brechungsindex der Sporenhülle im Phasenkontrast hell. Bei der Auskeimung kommt es zum Verlust von Sporenbestandteilen und Brüchigwerden der Sporenwand, gleichzeitig vermindert sich der Brechungsindex, und Phasenverdunkelung tritt ein. Der Abfall des Brechungsindex ist wahrscheinlich das gemeinsame Resultat der Ausscheidung trockener Substanzen, dem Anschwellen der Zelle und möglicherweise der Aufnahme und Umverteilung von Wasser innerhalb der keimenden Spore (BAVER [1]). Sogleich nach dem Platzen der Sporenwandung beginnt das Längenwachstum der vegetativen Zelle.

Vermehrung und Koloniebildung in der Objektträger-Kultur

Lockenbildung

2—4 B/Min.

Auf künstlichen Nährböden bilden die Milzbrandbazillen lange, zusammenhängende Ketten, aus denen sich beim Längenwachstum — das auf festen Nährböden nur in einer Ebene erfolgen kann — Schleifen und Locken formen. Derartige Gebilde sind auch makroskopisch als charakteristische Ausläufer von Agarkulturen zu erkennen und haben den Milzbrandkolonien den Namen „Medusenhaupt“ eingetragen.

Koloniebildung auf Blutagar bei normaler Sauerstoff-Atmosphäre

Rauhe Kolonieform

30 B/Std.

Die Rauhform von *B. anthracis* mit dem typischen Koloniebild („Medusenhaupt“) wird auf künstlichen Nährböden in Anwesenheit von genügend Sauerstoff gebildet und enthält unbekapselte, jedoch voll virulente Bakterien.

Koloniebildung auf Blutagar bei 20% CO₂ enthaltender Atmosphäre
Glatte Kolonieform

30 B/Std.

Bei erhöhter CO₂-Spannung bildet *B. anthracis* runde, glatte, glänzende Kolonien (S-Form). Die Bazillen sind bekapselt und wie die R-Form virulent.

Sporenbildung bei Gegenwart von Sauerstoff
Zerfall der Restzellen und der nicht versporteten Zellen

1—2 B/Min.

Der Beginn der Sporenbildung läßt sich an der Ausbildung eines dunklen Zellbezirks, der Vorspore, erkennen. Die Sporenreifung setzt mit dem Erscheinen des lichtbrechenden Sporenmantels ein.

Ausbleiben der Sporenbildung und Zerfall der Zellen bei
Sauerstoffmangel

2 B/Min.—30 B/Std.

Bei Mangel an Sauerstoff — z. B. im Tierkörper — vermag die vegetative Form nicht zu versporen und die Bazillen sterben rasch ab.

Einwirkung von Penicillin auf die Vermehrung. Bildung von Invo-
lutionsformen und Zerfall der Zellen (Perlschnurtest)

2 B/Min.

Die Einwirkung von Penicillin auf die wachsende Zelle hat zur Folge, daß das netzartige Grundgerüst der Zellwand, das Murein, nicht mehr geschlossen werden kann. Das bakterielle Zytoplasma wächst jedoch noch weiter und wölbt sich, umgeben von der zytoplasmatischen Membran, an den Zellwandlücken hervor. Auf diese Weise entsteht ein kugeliges, fragiles Gebilde — der Sphäroplast — der unter nicht isotonischen Verhältnissen alsbald lysiert.

Literatur

- [1] BAVER, R.: In: „Analytical Cytology“ (R. C. Mellor, ed.) 2nd ed., p. 169. Mac Graw-Hill, London 1969.
- [2] GOULD, G. W., and A. HURST (ed.): The Bacterial Spore. Academic Press, London-New York 1969.

- [3] HALVORSON, H. O., I. C. VARY and W. STEINBERG: Developmental changes during the formation and breaking of the dormant state in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **20** (1966), 169—188.
- [4] HIGHTON, P. I., and D. G. HOBBS: Penicillin and cell wall synthesis: a study of *Bacillus subtilis* by electron microscopy. *J. Bact.* **109** (1972), 1181—1190.
- [5] HUTYRA, MAREK, MANNINGER, MÓCSY: *Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere*, 1. Band: Infektionskrankheiten. Jena 1959.
- [6] MERCHANT, I. A., and R. A. PACKER: *Veterinary Bacteriology and Virology* (7th ed.) Iowa State Univ. Press 1967.
- [7] SCHAEFFER, P.: Sporulation and the production of antibiotics, exoenzymes and exotoxins. *Bacteriol. Rev.* **33** (1969), 48—71.

Angaben zum Film

Das Filmdokument wurde 1960 zur Auswertung in Forschung und Hochschulunterricht veröffentlicht. Stummfilm, 16 mm, schwarzweiß, 128 m, 12 min (Vorführgeschw. 24 B/s).

Die Aufnahmen entstanden in den Jahren 1959 und 1960. Aus dem Veterinärhygienischen und Tierseuchen-Institut der Universität Gießen (Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. E. ROOTS), Dr. W. MÜNKER. Bearbeitet und veröffentlicht durch das Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen (Direktor: Prof. Dr.-Ing. G. WOLF), Dr. K.-H. HÖFLING; Aufnahme und Schnitt: E. HEYSE, Göttingen, und Dr. W. MÜNKER, Gießen.

Inhalt des Films

Der Film zeigt verschiedene Lebensformen des sporenbildenden Milzbrandbazillus (*Bacillus anthracis*). Es werden sowohl das Auskeimen der Sporen zu vegetativen Formen als auch die Bildung von Sporen aus vegetativen Formen dargestellt. Weitere Abschnitte zeigen die Vermehrung von *B. anthracis* und seine unterschiedliche Koloniebildung in O₂ und CO₂ enthaltender Atmosphäre sowie die Wirkung von Penicillin auf die Bazillen.

Summary of the Film

The film shows various living forms of the spore forming anthrax bacillus (*Bacillus anthracis*). Both the change to the vegetative forms and the formation of spores from vegetative forms of the spores are represented. Further sections show the multiplication of *B. anthracis* and its different colony formation in atmospheres containing O₂ and CO₂ and the effect of penicillin on bacilli.

Résumé du Film

Le film montre les diverses formes de vie des éléments générateurs des spores du bacille du charbon (*Bacillus anthracis*). On a présenté aussi bien la germination des spores évoluant vers les formes végétatives que la formation des spores à partir des formes végétatives. D'autres séquences montrent la propagation de *B. anthracis* et de la formation diverse de ses colonies dans une atmosphère contenant O₂ et CO₂ ainsi que l'action de la pénicilline sur les bacilles.