

# ENCYCLOPAEDIA CINEMATOGRAPHICA

Editor: G. WOLF

---

*E 273/1960*

**Proteus**  
**L-Phase durch Penicillinwirkung**

Mit 13 Abbildungen

GÖTTINGEN 1975

---

INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM

## Proteus L-Phase durch Penicillinwirkung

G. POETSCHKE, München

### Allgemeine Vorbemerkungen<sup>1</sup>

Die Bakteriengattung *Proteus* gehört zur Familie der Enterobacteriaceae. Sie ist in unserer Umwelt weit verbreitet, insbesondere in zerfallendem oder faulem organischen Material. Auch als Krankheitserreger des Menschen spielen *Proteus*-Arten keine geringe Rolle, besonders bei Infektionen der Harnwege. Die Gattung *Proteus* hat ihren Namen nach dem griechischen Meergott Proteus erhalten, der seine Gestalt dauernd wechseln konnte.

In der Tat ist der Gestaltwandel, zu dem alle Arten, besonders aber *Proteus mirabilis* und *Proteus vulgaris* befähigt sind, besonders groß. Diese beiden *Proteus*-Arten zeichnen sich durch ein Bewegungsverhalten aus, das in dieser Form nur bei ihnen vorkommt. Es handelt sich um die Ausbreitung über die ganze Oberfläche feuchter Nährböden. Näheres darüber in der Filmbeschreibung zu „Bewegungsvorgänge bei *Proteus*“ (POETSCHKE [9]).

Viele Bakterien vermögen unter der Einwirkung verschiedener Stoffe, die den Synthesevorgang der starren Zellwand stören, weiter zu „wachsen“ (PARK [6]; STROMINGER [8]; WEIBULL, 1968). Dies geschieht nicht mehr in der vertrauten und für die einzelne Art charakteristischen Form der Kokken oder Stäbchen, sondern unter Bildung leicht deformierbarer Gebilde. Diese sind beim Entstehen zuerst annähernd rund und werden „Sphäroplasten“ oder „large bodies“ genannt. Sie können zu recht großen, unregelmäßig gestalteten (amoeboiden) Formen auswachsen.

Diese „Sphäroplasten“ können durch Sprossung Tochterformen hervorbringen. Auf geeigneten, halbfesten Agarnährböden vermehren die Sprossen sich nicht nur auf der Oberfläche, sondern dringen in die Tiefe der Agarschicht ein, den flüssigkeitserfüllten Hohlräumen folgend. Es entstehen dabei charakteristische Kolonien, die sich an der Peripherie auf dem Nährboden ausbreiten, während sie im Zentrum in die Tiefe

<sup>1</sup> Angaben zum Film und kurzgefaßter Filminhalt (deutsch, englisch, französisch) s. S. 16 u. 17.

dringen. Mit der Zeit können sich auch sekundäre, periphere Zentren des Tiefenwachstums bilden. Diese Kolonien ähneln denen der Mykoplasmen sehr.

Diese Art des Wachstums und der Multiplikation hat KLIENEGER [4] 1935 als erste beschrieben. Sie hat diesem Phänomen anfangs eine andere Deutung gegeben. Sie hat diese Formen L-Formen genannt. Später ist auch der Ausdruck L-Phase benutzt worden.

Die L-Phase der Bakterien kann entweder labil oder stabil sein. Die labile L-Phase besitzt eine weiche Zellwand außerhalb der Cytoplasmamembran und kann beim Aufhören der Hemmung der Zellwandsynthese wieder die normale Ausgangsform (Stäbchen oder Kokken) hervorbringen. Die stabile L-Phase besitzt nicht mehr die Fähigkeit, Zellwandmaterial zu produzieren und ist nur von einer Cytoplasmamembran umgeben. Die stabile L-Phase hat auch die Fähigkeit verloren, wieder in die normale Ausgangsform zurückzukehren. Verschiedene Mechanismen, darunter die Mutation, werden diskutiert.

Eine andere Nomenklatur unterscheidet einen Typ A und einen Typ B der L-Kolonien, wobei erstere annähernd der stabilen oder stabilisierten, letztere der labilen L-Phase entsprechen. (DIENES [1]). „Sphäroplasten“ und „large bodies“ sind Begriffe, die sich meist decken. Wenn hier von „großen Körpern“ gesprochen wird, so ist damit, rein beschreibend, ein größeres Gebilde gemeint.

Über die L-Formen ist eine sehr umfangreiche Literatur entstanden. Eine gute Übersicht neuerer Ergebnisse findet man in dem Konferenzbericht von L. B. GUZE [2].

Penicillin ist einer der Stoffe, mit denen man bei vielen Bakterien die Bildung der L-Phase herbeiführen kann. Bei den hier gezeigten Versuchen wurde 200 E Penicillin-G-Natrium pro ml Nährboden zugefügt.

### Filmbeschreibung<sup>1</sup>

#### *Bildung und Wachstum großer Körper*

4 B/min

#### *Proteus mirabilis (28)*

1. Die ausgesäten Stäbchen zeigen keinerlei Multiplikation. Es kommt rasch zum Austreten von kleinen, runden Gebilden aus einer (meist in der Mitte des Stäbchens gelegenen) Lücke der Zellwand. Diese runden Körper vergrößern sich rasch zu einem typischen „Sphäroplasten“.
2. Der gleiche Vorgang wie vorher. Die Stäbchen, aus denen die Sphäroplasten hervorgegangen sind, werden blaß. Zwischen den wachsenden Sphäroplasten sind sie bald nicht mehr zu sehen. Im Gesichtsfeld

<sup>1</sup> Die *Kursiv*-Überschriften entsprechen den Zwischentiteln im Film.

tauchen schließlich bewegliche Stäbchen auf, die wahrscheinlich aus einem anderen Bereich des Präparates stammen, wo bereits Rückwandlungen von Sphäroplasten zu Stäbchen eingetreten waren.

### *8 B/min*

3. Die sich bildenden Sphäroplasten wachsen zu amoeboiden Gebilden aus. Die Ähnlichkeit mit Amöben ist besonders groß, denn es entstehen Vakuolen, die zum Teil wieder verschwinden, und nach einiger Zeit sieht man Kontraktionsbewegungen. Eine Analyse der Beziehungen von Entstehen und Vergehen der Vakuolen zu dem, was wir Kontraktionsbewegungen genannt haben, wird unten gegeben werden.

### *Bildung von L-Kolonien aus großen Körpern*

#### *1 B/min*

Während alle bisherigen Aufnahmen mit Phasenkontrast-Beleuchtung erfolgten, wurden die Vorgänge dieses Abschnitts mit dem Interferenzkontrast-Verfahren gefilmt. Dies war nötig, da das Phasenkontrast-Verfahren bei Objektiven größerer Dicke (Kolonien mit Tiefenwachstum) wegen der hellen Interferenzsäume um die dickeren Objekte keine brauchbaren Bilder ergibt.

Bei dem Interferenzkontrast-Verfahren werden verschieden dichte Objekte in verschiedenen Stufen der Helligkeit abgebildet. Mit zunehmender optischer Dichte (Dicke) folgen sich die Helligkeitswerte graudunkelgrau-schwarz-hell. Mit zunehmender Dichte beginnt diese Skala von neuem.

4. Auf der Oberfläche des Agars kommt es zu einer Multiplikation der Sphäroplasten. Gelegentlich kommt es zur Lyse einzelner heller Sphäroplasten. An einigen Stellen kommt es zum Wachstum der Kolonie in die Tiefe. Die in die Tiefe dringenden Fortsätze sind viel kleiner, als die auf der Oberfläche des Agar liegenden und sich vermehrenden Formen.

5. Ausgehend von bereits bestehenden kleinen Gruppen von Sphäroplasten, kommt es zur Bildung von Oberflächen- und Tiefenwachstum von L-Kolonien. Gelegentlich kann man sehen, wie aus dem Zentrum (wahrscheinlich aus dem Tiefenwachstum) Sphäroplasten in die Peripherie der Kolonie gedrängt werden.

### *Rückverwandlung großer Körper in Stäbchen*

#### *8 B/min*

6. u. 7. In zwei Einstellungen wird gezeigt, wie Sphäroplasten einer labilen L-Kolonie, die auf einen Nährboden gebracht wurden, der Penicillinase enthält, unter eigentümlichem Formwandel wieder zu beweglichen Stäbchen werden.

Sehr rasch kommt es zu einem gerichteten Wachstum der runden großen Körper zu Hantel- und Regenwurmformen. Diese Formen strecken sich weiter, werden dünner und beginnen sich zu verzweigen (sog. Hirschgeweihformen, Abb. 8—10). An den dünnsten Stellen tritt Querteilung auf; bewegliche Stäbchen entstehen. Der Cyclus Stäbchen-L-Phase-Stäbchen ist beendet. Gelegentlich kommt es dabei längere Zeit zum Längenwachstum einer Regenwurmform, die schließlich durch Querteilung in stäbchenartige Gebilde zerfällt.

### Stabile L-Phase

1 B/min

Benutzt wurde eine stabile L-Phase aus *Proteus morgani* (Stamm 18 von Dr. MINCK, Straßburg).

8. Das Wachstums- und Multiplikations-Verhalten der stabilen L-Phase ähnelt insofern der labilen Phase, als ebenfalls Kolonien mit Tiefenwachstum im Zentrum und Oberflächenwachstum in der Peripherie entstehen. Anstelle der Multiplikation von Sphäroplasten, tritt hier die Bildung von granulären Formen und von Blasen.

Eine eingehende Analyse der Multiplikationsverhältnisse gelang bei diesen, sich vielfach überlagernden, Formen nicht.

## Quantitative Ergebnisse

### 1. Bildung von Sphäroplasten

Abb. 1 zeigt die zeitliche Entstehung von Sphäroplasten aus 3 Stäbchen. Das Austreten von Protoplasma aus dem Stäbchen erfolgt immer in der Mitte des Stäbchens (Sollbruchstelle der Querteilung). Eines der Stäbchen (Pfeil) entläßt zwei Sphäroplasten in einem Abstand von 47,5 min (Abb. 1). Zwischen der 75. und 88. Minute kommt es anscheinend zu einem Verschmelzen der beiden, aus einem Stäbchen entstandenen, Sphäroplasten.

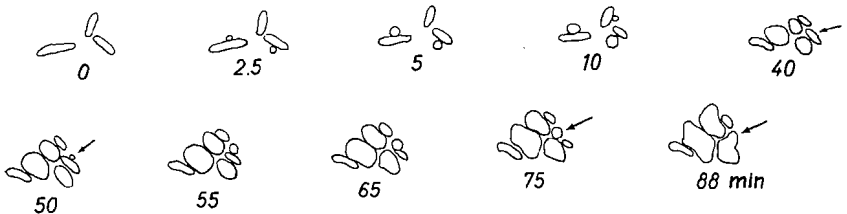


Abb. 1. Austreten von zwei Protoplasten aus einem Stäbchen und Verschmelzung der beiden zu einem "large body"

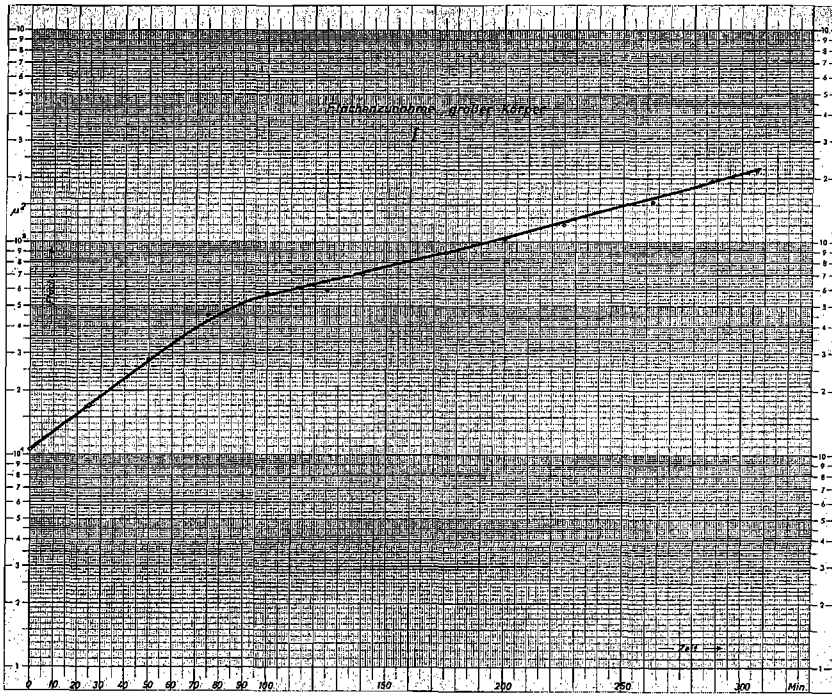


Abb. 2

## 2. Wachstum der Sphäroplasten

Das Wachstum großer Körper wurde in zwei Fällen messend verfolgt, wobei die Flächenzunahme für die Volumenzunahme gesetzt wurde. Dies ist hier möglich, da die Tiefenausdehnung zwischen Agar und Deckglas praktisch konstant bleibt. Im halblogarithmischen Raster resultierten in beiden Fällen zwei sehr ähnliche Kurven, die aus zwei nahezu geraden Schenkeln bestanden, die zwischen der 80. und 100. Minute einen Knick aufwiesen (Abb. 2). Die Form der Kurve zeigt eindeutig, daß es sich nicht darum handeln kann, daß durch die Vergrößerungen des Gesamtvolumens der Stofftransport verschlechtert wird und damit die Syntheseleistung allmählich beeinträchtigt wird. In diesem Fall hätte eine gekrümmte Kurve resultieren müssen, die nach oben konvex wäre. Aus der vorliegenden Kurve muß man vielmehr schließen, daß durch einen noch nicht bekannten Faktor die Gesamtsyntheseleistung

zwischen der 80. und 100. Minute grundlegend verändert und um einen konstanten Faktor verlangsamt wurde. Vielleicht ist es die Hemmung der Synthese von Zellwandsubstanz.

### Kontraktion und Vakuolenbildung

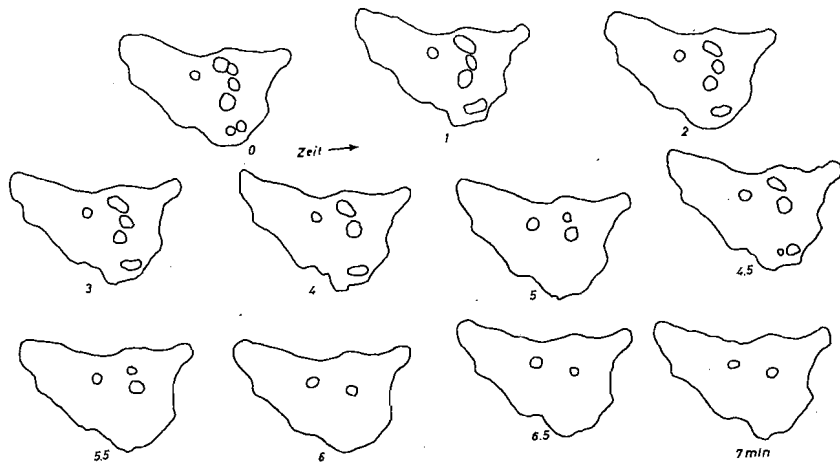


Abb. 3

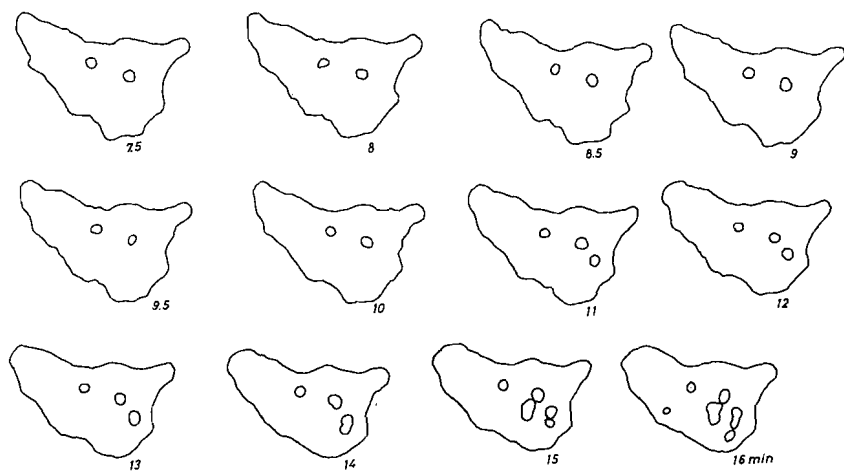


Abb. 4

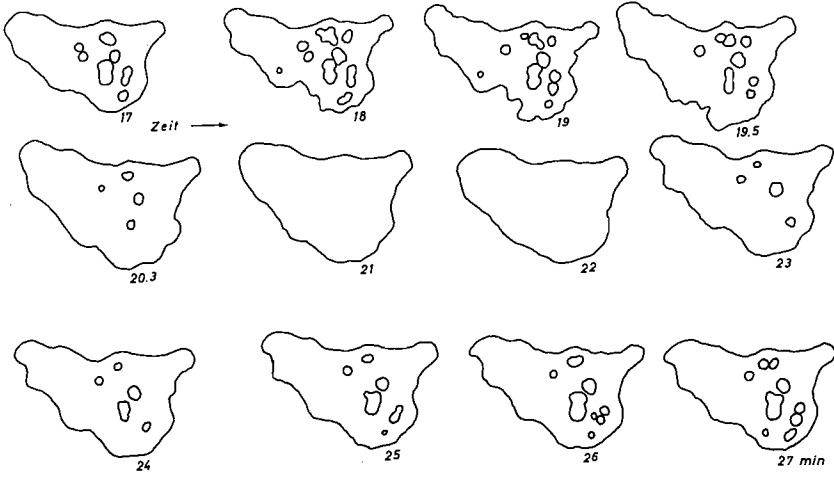


Abb. 5

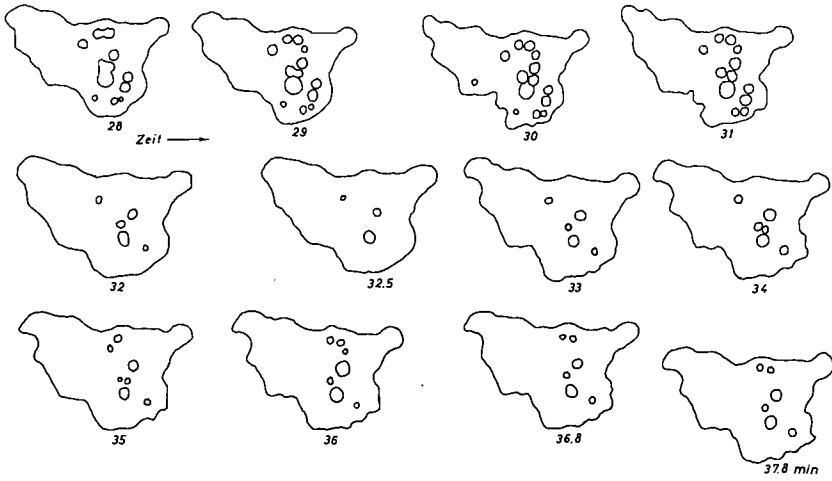


Abb. 6



### 3. Vakuolenbildung und Kontraktion von Sphäroplasten

Nach Erreichen einer gewissen Größe treten in den Sphäroplasten eine oder mehrere Vakuolen auf (Abb. 3—6). Einzelne der Vakuolen können plötzlich verschwinden (Entleerung nach außen?). Hierbei kann der ganze Sphäroplast plötzlich zerfallen.

Ganz unerwartet war das vom Zeitrafferfilm enthüllte Auftreten von Kontraktionsbewegungen derartiger großer Körper (Abb. 5—7). Einer der ausgemessenen großen Körper nahm dabei von 14,1 auf 10,4  $\mu\text{m}^2$  ab. Das beanspruchte 3,5 min. Die ursprüngliche Größe wurde nach 14 Minuten noch nicht ganz wieder erreicht (Abb. 7).

Kontraktion und Vakuolenbildung

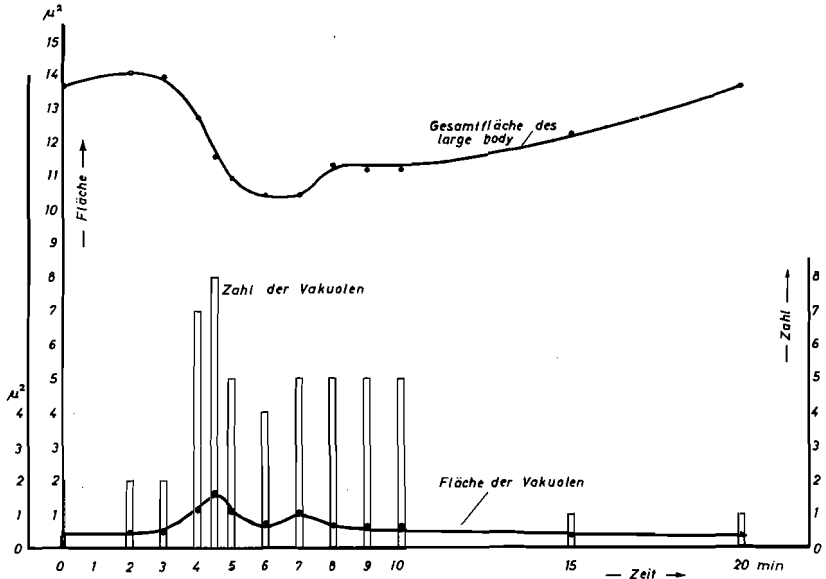


Abb. 7

Bei der subjektiven Beobachtung sind keinerlei Kontraktionsbewegungen großer Körper bisher beobachtet worden. Bei der Zeitraffung kann man aber in unserem *Proteus*-Film mehrere große Körper mehrfach Kontraktionsbewegungen ausführen sehen. Insbesondere fällt auf, daß im Verlauf des Kontraktionsvorganges Vakuolen sichtbar werden und wieder vergehen. Die am nächsten liegende Erklärung war, daß durch die Entleerung von Vakuolen das Volumen der großen Körper verringert und damit eine Kontraktion vorgetäuscht wird. Die Aus-

wertung zeigt jedoch, daß die Zahl der Vakuolen und ihre projizierte Fläche im Verlauf der Kontraktion stark erhöht werden (Abb. 7). Die Volumenabnahme kann also nicht eine Folge der Ausstoßung von Vakuoleninhalt sein. Diese zeitliche Koordinierung von Kontraktion und Auftreten von Vakuolen ist an mehreren großen Körpern festzustellen gewesen. Die einzige sich bisher anbietende Erklärung für den in Abbildung 7 analysierten Vorgang ist, daß das Protoplasma der „large bodies“ die Fähigkeit zu aktiver Kontraktion besitzt. Diese Vorgänge müssen allerdings noch genauer untersucht werden, ehe man mit Sicherheit davon sprechen kann, daß Protoplasten aktive Kontraktionsvorgänge durchführen können.

#### 4. Rückverwandlung großer Körper in Stäbchen

Die Rückverwandlung unter Penicillinasewirkung erfolgt meist über die Bildung sog. „Hirschgeweih-Formen“ (Abb. 8), seltener (bei rudimentärer Verzweigung) unter vorwiegender Längsstreckung (Abb. 9—10). Hierbei folgt das Wachstum der beobachteten Population einer Exponentialfunktion (gerade Linie im halblogarithmischen Raster), wogegen die Zahl der entstehenden Elemente zeitweise viel schneller zunimmt und eine S-förmige Kurve bildet (Abb. 11).

Rückverwandlung großer Körper in Stäbchen

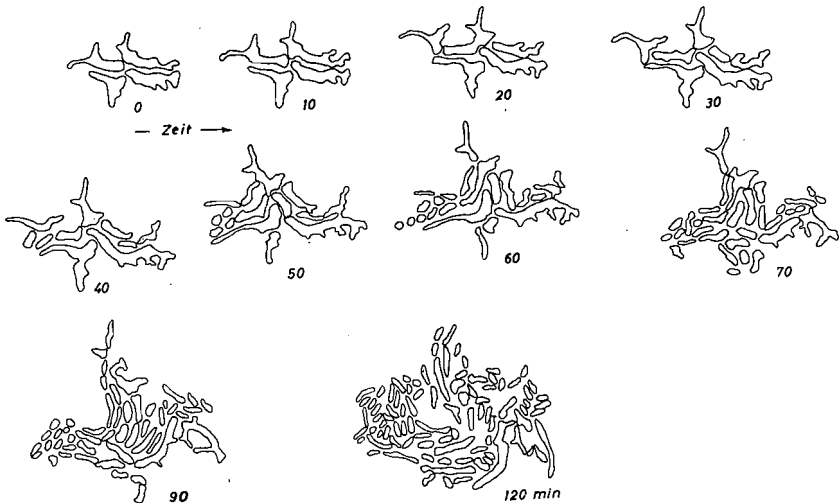


Abb. 8

Rückverwandlung großer Körper in Stäbchen

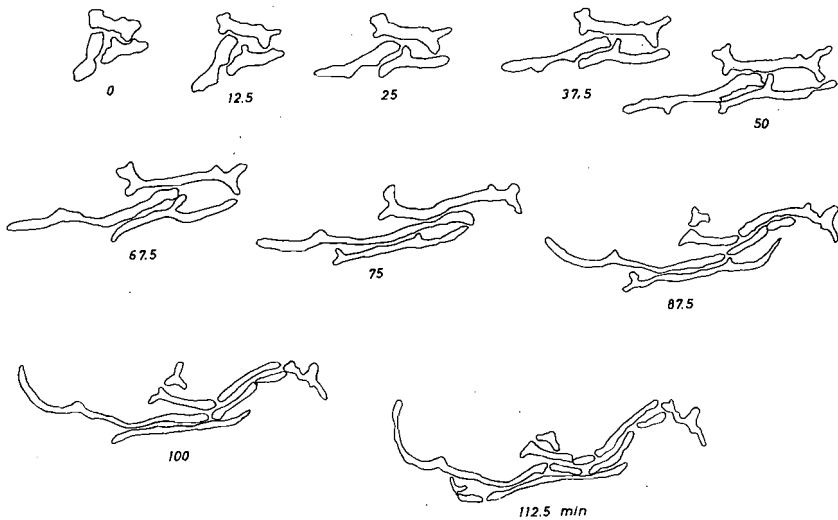


Abb. 9

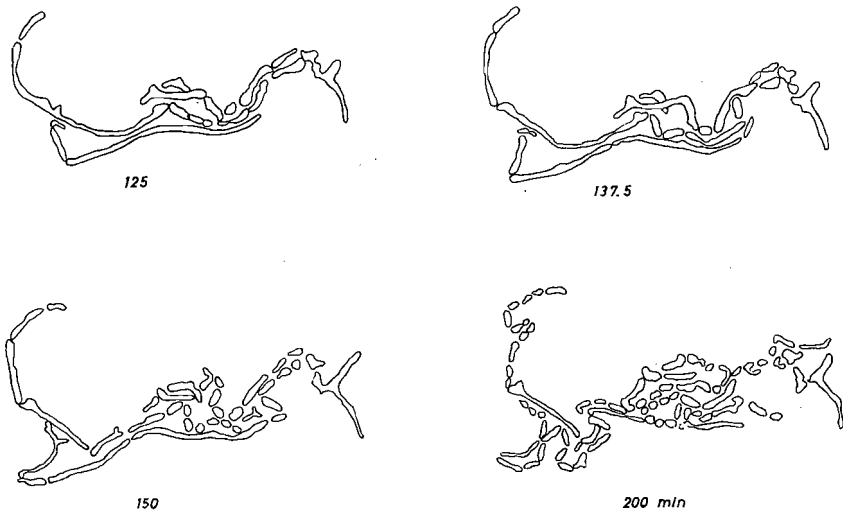


Abb. 10

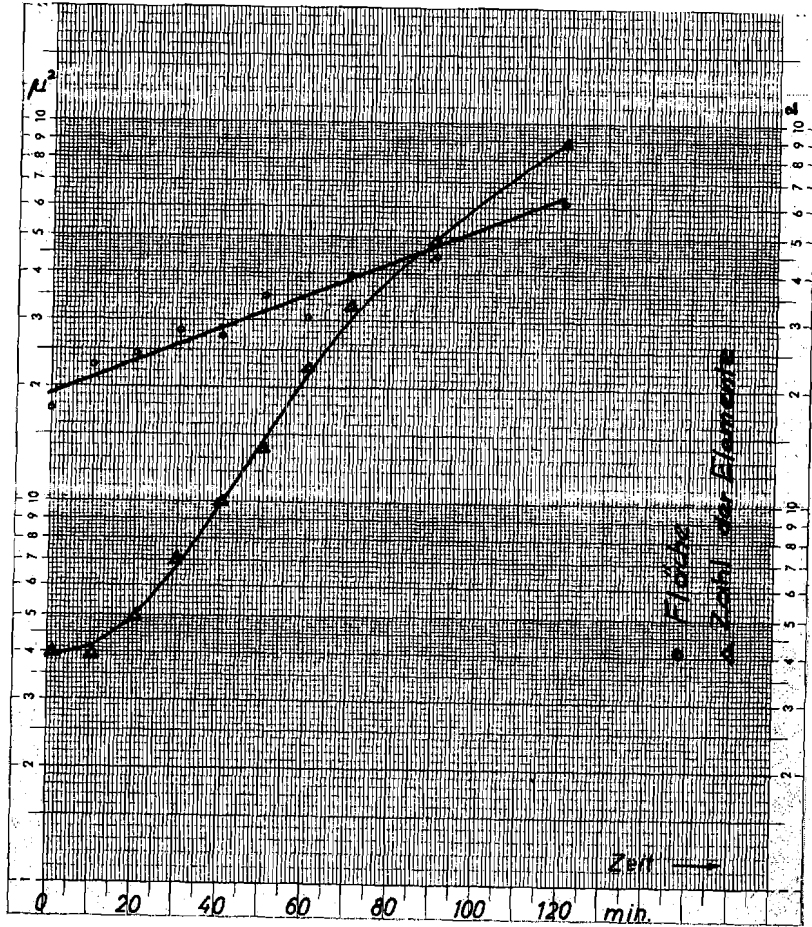


Abb. 11

### 5. Wachstum von L-Kolonien

Sowohl das Wachstum einer labilen (Abb. 12) wie einer stabilen L-Kolonie (Abb. 13) wurden gemessen. In beiden Fällen ergeben sich wieder gerade Linien. Das Wachstum der labilen Phase ist viel langsamer als das der stabilen. Ehe nicht weitere derartige Kurven vorliegen, kann nicht geurteilt werden, ob es sich um eine grundsätzliche Differenz handelt. Es läge nahe, bei der stabilen Phase ein besseres Angepaßtsein an die besonderen Wachstumsbedingungen anzunehmen.

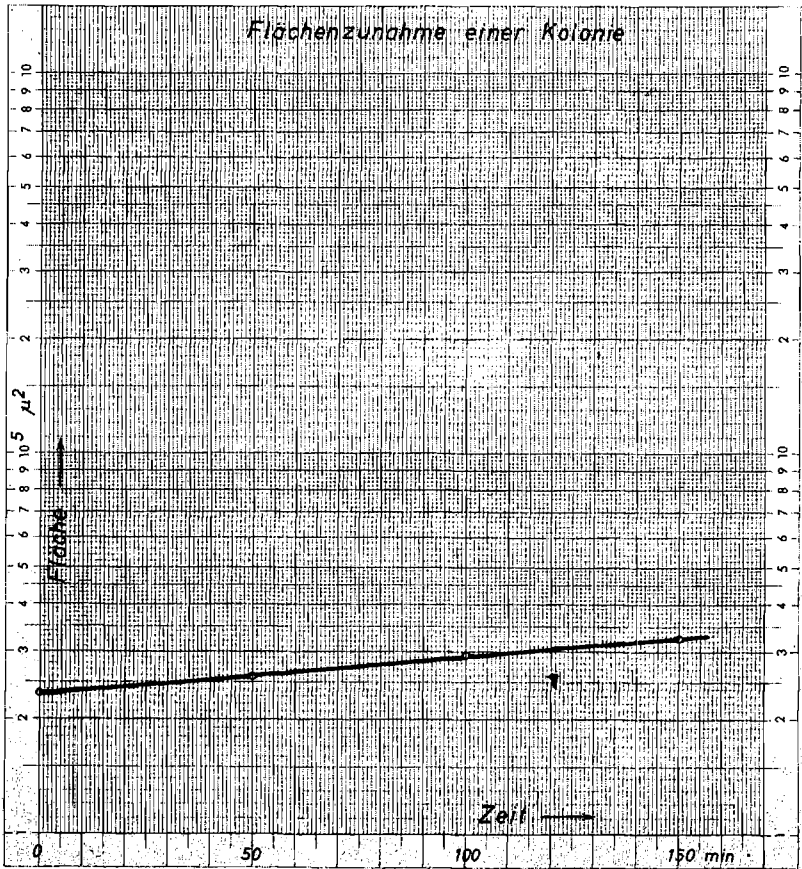


Abb. 12

### Danksagung

Herrn H. H. HEUNERT möchte ich auch an dieser Stelle für das große Verständnis und die unermüdete Unterstützung bei der mühsamen und zeitraubenden Durchführung der Aufnahmen danken, deren technische Leitung in seiner Hand lag. Fräulein BRIGITTE MILTHALER hat mit großer Einfühlungsgabe die schwierige meßtechnische Auswertung durchgeführt.

Die Durchführung der Filmaufnahmen und ihre Auswertung wurden durch die großzügige Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, und des Instituts für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen, ermöglicht.

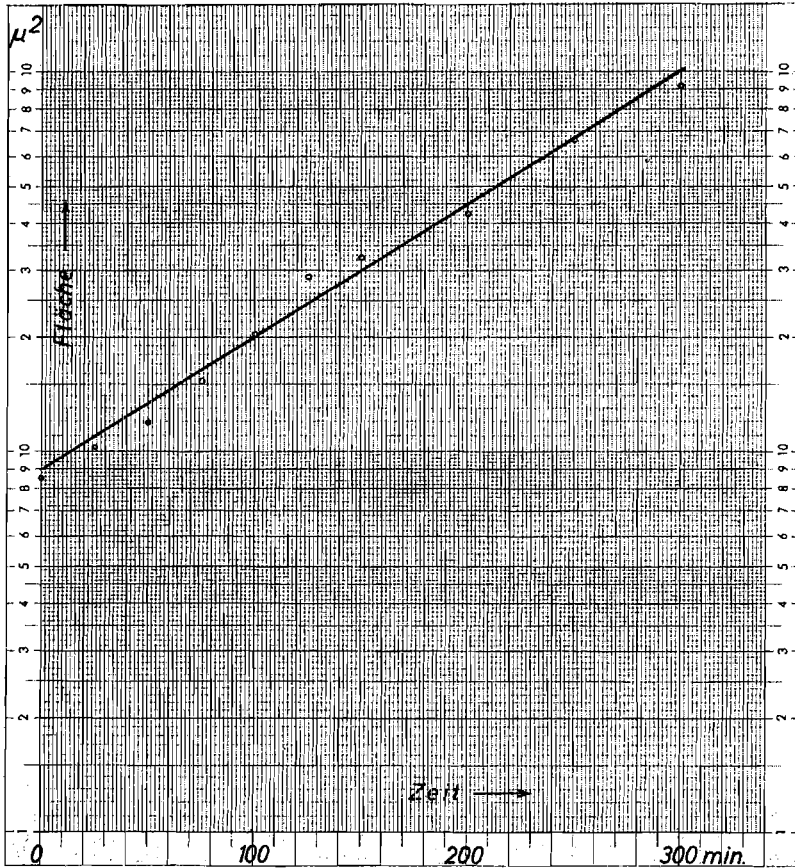


Abb. 13

### Literatur und Filmveröffentlichung

- [1] DIENES, L.: Morphology and Reproductive Processes of Bacteria with Defective Cell Wall. In: Microbial Protoplasts, Spheroplasts and L-Forms; Baltimore 1968.
- [2] GUZE, L. B.: Microbial Protoplasts, Spheroplasts and L-Forms. The Williams Wilkins Company, Baltimore 1968.
- [3] HEUNERT, H. H.: Die Anwendung der Mikrokinematographie in der bakteriologischen Forschung. In: Der Film im Dienste der Wissenschaft. Göttingen 1961, S. 115.

- [4] KLIENEBERGER, E.: The natural occurrence of pleuropneumonia-like organisms in apparent symbiosis with *Streptobacillus moniliformis* and other bacteria. *J. Path. Bact.* **40** (1935), 93.
- [5] MILTHALER, BRIGITTE: Meßtechnische Auswertung von Forschungsfilm-aufnahmen. In: *Der Film im Dienste der Wissenschaft*. Göttingen 1961, S. 138.
- [6] PARK, J. T.: The Mechanism by Which Penicillin Causes Conversion of Bacterial Cells to Spheroplasts. In: *Microbial Protoplasts, Spheroplasts and L-Forms*. Baltimore 1968.
- [7] POETSCHKE, G.: Kinematographische Studien an *Proteus*. *Path. Microbiol.* **24** (1961), 1019—1034.
- [8] STROMINGER, J. L.: Enzymatic Reactions in Bacterial Cell Wall Synthesis Sensitive to Penicillins and Other Antibacterial Substances. In: *Microbial Protoplasts, Spheroplasts and L-Forms*. Baltimore 1968.
- 
- [9] POETSCHKE, G.: *Proteus* — Bewegungsverhalten. Film E 271 des Inst. Wiss. Film, Göttingen 1960.
- 

### Angaben zum Film

Das Filmdokument wurde 1960 zur Auswertung in Forschung und Hochschulunterricht veröffentlicht. Stummfilm, 16 mm, schwarzweiß, 90 m, 8 $\frac{1}{2}$  min (Vorführgeschw. 24 B/s).

Die Aufnahmen entstanden im Jahre 1959. Veröffentlichung aus der Abteilung für Mikrobiologie und Serologie der Deutschen Forschungsanstalt für Psychiatrie, München, Prof. Dr. G. POETSCHKE, und dem Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen, Dr. K.-H. HÖFLING; Aufnahme: H. H. HEUNERT.

### Inhalt des Films

Bei *Proteus* führt Einwirkung höherer Konzentrationen von Penicillin zur Bildung der sog. L-Phase. Dabei treten zunächst aus den ausgesäten Stäbchen kleine runde Gebilde aus, die sich rasch zu Sphäroplasten vergrößern. Die Sphäroplasten wachsen zu „amoeboiden“ Gebilden aus, in denen Vakuolen entstehen. Die Sphäroplasten vermehren sich und wachsen an einigen Stellen in die Tiefe des Nährbodens und bilden dann die sog. L-Kolonien. Wenn die Penicillinwirkung aufgehoben wird, kommt es allmählich zu einer Rückbildung der oben geschilderten Erscheinungen, und es entstehen wiederum allmählich stäbchenartige Gebilde, die sich quer teilen. Es ist auch möglich, daß eine stabile L-Phase entsteht, bei der eine solche Rückbildung nicht mehr erfolgen kann. Deren Multiplikation wird gezeigt. Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung werden im Begleittext eingehend beschrieben.

### Summary of the Film

With *Proteus* the action of higher concentrations of penicillin leads to the formation of the so-called L-phase. First small round structures emerge from the bacterial rods, rapidly enlarging to spheroplasts. These grow into "amoeboid" structures in which vacuoles develop. The spheroplasts multiply and in some places grow deeply into the culture medium where they form the so-called L-colonies. When the penicillin action is suspended there is a gradual regression of the described events and gradually rod-like structures develop again which divide transversely. A stable L-phase may also develop where this regression can no longer occur. Its multiplication is demonstrated.

The results of quantitative evaluation are described in detail in the accompanying text.

### Résumé du Film

Chez les *protéus* l'influence de concentrations plus élevées de pénicilline mène à la formation de la phase appelée "phase L". D'abord de petites formations rondes sortent des bâtonnetsensemencés, elles grandissent rapidement et deviennent des sphéroplastés. Les sphéroplastés deviennent des formes "amoéboïdes" dans lesquelles se forment des vacuoles. Les sphéroplastés se multiplient, à plusieurs endroits ils poussent vers la profondeur du milieu de culture et forment alors les colonies dites "L". Lorsque l'action de la pénicilline est supprimée on constate progressivement une régression des manifestations décrites ci-dessus, des bâtonnets qui se divisent en sens transversal se reforment graduellement. La formation d'une phase "L" stable est également possible, dans ce cas une régression n'est plus possible. On démontre sa multiplication.

Les résultats de l'évaluation quantitative sont décrits en détail dans le contexte.