

ENCYCLOPAEDIA CINEMATOGRAPHICA

Editor: G. WOLF

E 1633/1970

Mycoplasma pneumoniae (Mycoplasmataceae) Bewegung, Vermehrung und Koloniebildung

Mit 1 Abbildung

GÖTTINGEN 1971

INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM

Mycoplasma pneumoniae (Mycoplasmataceae) **Bewegung, Vermehrung und Koloniebildung¹**

W. BREDT, Würzburg

Allgemeine Vorbemerkungen

Die Ordnung der Mycoplasmatales umfaßt bakterienähnliche Mikroorganismen, die nur von einer dreischichtigen Zellmembran umgeben werden und sich dadurch — neben anderen Besonderheiten — von den Bakterien unterscheiden. Das Fehlen einer starren Zellwand hat zur Folge, daß die *Mycoplasma*-Zellen schon durch geringfügige Einwirkungen äußerer Kräfte, z. B. durch Druck, Strömungen, Fixierungs- und FärbeprozEDUREN, erheblich verformt werden können. Die Bewertung aller an Mycoplasmen erhobenen morphologischen Befunde fiel daher stets sehr unterschiedlich aus. Die beobachteten verschiedenartigen Strukturen — kokkoide Gebilde, Ringe, Sterne, verzweigte und unverzweigte Filamente — wurden teils als Artefakte, teils als Produkte besonderer Wachstumszyklen angesehen (HAYFLICK [6]). Allgemein wurde eine Entwicklung submikroskopisch kleiner (150 µm) vermehrungsfähiger Einheiten zu größeren runden oder filamentösen Strukturen angenommen, aus denen dann durch Plasmaverdichtung bzw. Fragmentierung wiederum zahlreiche kleinste Reproduktionseinheiten entstehen sollten (HAYFLICK [6]). Auch Sprossung und Zweiteilung wurden als mögliche Vermehrungsmechanismen diskutiert.

Die Frage der Vermehrungsweise konnte durch Untersuchung nacheinander entnommener Einzelproben aus einer Kultur nicht gelöst werden. Auch die fortlaufende Beobachtung wachsender Mycoplasmen auf Agarnährböden brachte keine sicheren Ergebnisse.

¹ Angaben zum Film und Filminhalt (deutsch, englisch, französisch) s. S. 8 u. 9.

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Die leichte Verformbarkeit der *Mycoplasma*-Zellen ließ erwarten, daß sich typische Zellformen am besten in flüssigem Medium ausbilden würden. Entsprechende Untersuchungen wurden erstmals an *Mycoplasma pneumoniae* in einer geschlossenen Deckglaskammer ausgeführt (BREDT [2]).

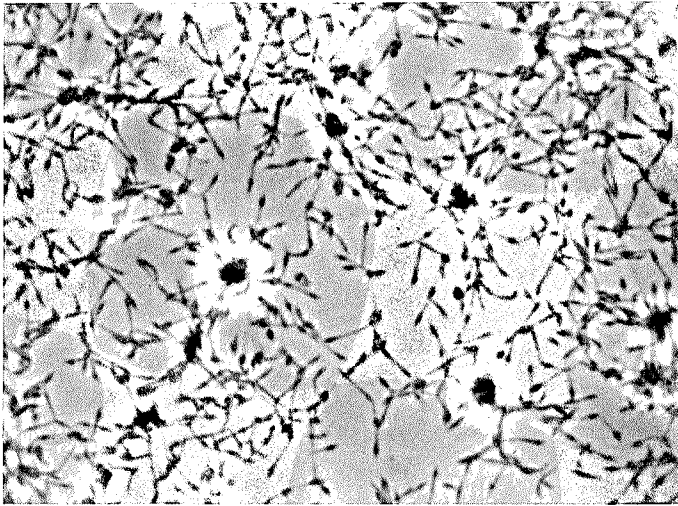
Angaben zu *Mycoplasma pneumoniae*

Unter den beim Menschen vorkommenden Mycoplasmatales ist *M. pneumoniae* die bisher einzige Spezies, deren Pathogenität klinisch und experimentell gesichert werden konnte. In seinen sonstigen biologischen Eigenschaften gleicht *M. pneumoniae* weitgehend den anderen Mycoplasmen: Es vermag auf proteinhaltigen künstlichen Nährböden zu wachsen, benötigt Cholesterin und ist gegen Penicillin absolut resistent. Weiterhin kann diese Spezies Glukose fermentieren; Tetrazolium und Methylenblau werden reduziert. Eine starke Produktion von Wasserstoffperoxyd bewirkt auf bluthaltigen Nährböden Hämolyse und wird als wesentlicher Pathogenitätsfaktor diskutiert. Auffällig ist der gegenüber anderen *Mycoplasma*-Arten sehr hohe GC-Quotient der DNS (39%) von *M. pneumoniae* (HAYFLICK [6]), der auf eine besondere Stellung dieser Spezies innerhalb der Mycoplasmatales hinweist.

M. pneumoniae haftet sehr gut an Glasoberflächen (SOMERSON et al. [9]). Die ersten phasenkontrastmikroskopischen Beobachtungen der an einem Deckglas in flüssigem Medium wachsenden *M. pneumoniae*-Zellen (BREDT [2]) zeigten ein regelloses Netzwerk von kurzen, teilweise zusammenhängenden Filamenten mit verdickten Enden (Abb.). Dazwischen fanden sich kolonieähnliche Anhäufungen unterschiedlicher Größe. Spätere Untersuchungen (BREDT [3], [4]) zeigten, daß *M. pneumoniae* sich durch Zweiteilung vermehrt und daß die typischen kurzen Filamente aus sich teilenden Zellen bestehen, die sich während des Teilungsprozesses voneinander entfernen und nur noch durch einen dünnen Plasmastrang miteinander verbunden sind. Nach der Teilung gleiten die zwei entstandenen Tochterzellen in verschiedenen Richtungen davon und bewegen sich für längere Zeit in meist kreisförmigen Bahnen. Durch das Aufeinandertreffen gleitender und ruhender Zellen entstehen zahlreiche irreguläre Strukturen.

Wie sich bei weiteren Untersuchungen an anderen *Mycoplasma*-Arten (BREDT [5]) herausstellte, ist die zelluläre Morphologie von *M. pneumoniae* von den Zellformen der anderen Arten völlig verschieden. Auch eine Beweglichkeit wurde an anderen Spezies nicht beobachtet. In der Literatur finden sich lediglich zwei Mitteilungen (ANDREWES and WELCH [1], NELSON and LYONS [8]), die bewegliche Zellen bei einer anderen *Mycoplasma*-Art erwähnen, eine sichere Dokumentation dieser Befunde liegt jedoch nicht vor.

Besondere Zellstrukturen, die für die Beweglichkeit wesentlich sein könnten, wurden an *M. pneumoniae* nicht gefunden, der Mechanismus der Fortbewegung ist bisher nicht bekannt.



M. pneumoniae Stamm FH an Glas
Vergrößerung 2500

Die Filmaufnahmen zeigen deutlich die gleitenden Bewegungen der durchschnittlich $1,6 \mu\text{m}$ langen und $0,3 \mu\text{m}$ breiten Mycoplasma-Zellen, die Geschwindigkeiten bis zu $0,5 \mu\text{m/s}$ erreichen können. Über den Einfluß einzelner Nährbodenbestandteile, insbesondere der Glukose, auf die Beweglichkeit liegen bisher keine Angaben vor. Die Zweiteilung als typische Vermehrungsform ist in der entsprechenden Szene gut zu erkennen. Die Teilungszeit ist gegenüber vorherigen Beobachtungen (BREDT [4]) verlängert, eine Erscheinung, die wahrscheinlich auf die intensive Lichteinwirkung zurückzuführen ist. Erstmals konnte die Entstehung von Kolonien aus einzelnen Zellen beobachtet und dokumentiert werden. Die im Film erkennbare Bewegung der Kolonien war bisher noch nicht bekannt. Das Altern der Kultur ist im Film von dem Verschwinden der Einzelzellen begleitet. Der Absterbeprozess dürfte neben Nährstoffmangel hauptsächlich durch die aus Glukose entstehende Säure und durch das gebildete Wasserstoffperoxyd gefördert werden.

Zur Entstehung des Films

Das verwendete Nährmedium bestand aus 70% PPLO-Broth (Difco-Laboratories), 20% Agamma Horse Serum und 10% Hefeextrakt oder Hefedialysat (Microbiological Associates). Die Viskosität des Mediums

wurde durch Zusatz von 3,5% Gelatine erhöht, gelegentlich wurden 0,1—0,2% Glukose zugesetzt. Das Medium wurde filtriert (0,45 μ m), mit *M. pneumoniae* Stamm FH beimpft und in sterile Deckglaskammern gefüllt. Diese Kammern wurden aus zwei Deckgläsern und einem Teflonring (Höhe 1 mm, Durchmesser 12 mm) zusammengesetzt, Gläser und Ring wurden durch Siliconfett (mittelviskös, Bayer) aneinander befestigt. Für die Interferenzaufnahmen wurden statt der Teflonringe dünne Teflonscheiben verwendet. Die Kammern wurden in kleinen Stahlrahmen befestigt (HEUNERT [7]). Die Mycoplasmen wurden entweder am oberen Deckglas hängend (Phasenkontrast, Interferenzmikroskopie) oder auf dem unteren Deckglas aufliegend (Phasenkontrast) beobachtet. Die Bebrütung erfolgte bei 37° C durch besondere, die Mikroskope umschließende Heizkästen (HEUNERT [7]). Für die Darstellung der Koloniebildung wurde das Inokulum filtriert (0,45 μ m), so daß die Kammer anfangs nur Einzelzellen enthielt.

Filmbeschreibung¹

15 und 8 B/min

1. Einstellung (Phasenkontrast, „hängend“): Mehrere kleine Kolonien und zahlreiche Einzelzellen, teilweise in Filamentform. Mehrere Zellen bewegen sich. 15 B/min, Vergrößerung 214fach.

2. Einstellung (Interferenzaufnahme, „hängend“): Zwei größere Kolonien mit zahlreichen Filamenten und mehreren sich bewegendenden Zellen. Die verdeckten Enden der Filamente sind nahezu plastisch zu erkennen, ebenso die dicken „Köpfe“ der gleitenden Zellen. 8 B/min, Vergrößerung 161fach.

Auswandern von Einzelzellen aus Kolonien

8 und 4 B/min

3. Einstellung (Phasenkontrast, „aufliegend“): Kolonie mit mehreren umgebenden Filamenten. Neue Zellen wachsen heraus und wandern zum Teil weg. 8 B/min, Vergrößerung 214fach.

4. Einstellung (Phasenkontrast, „hängend“): Kolonie mit umgebenden Filamenten, Hervorwachsen und Ablösen von neuen Zellen wie in 3., am Ende der Szene ist rechts unter der Kolonie das Zusammentreffen und Auseinanderwandern mehrerer Zellen zu sehen. 4 B/min, Vergrößerung 202fach.

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

Fortbewegung

1 und 4 B/s

5. Einstellung (Interferenzaufnahme, „hängend“): Zahlreiche bewegliche Zellen, die in meist kreisförmigen Bahnen am Glas entlanggleiten. 1 B/s, Vergrößerung 161fach.

6. Einstellung (Phasenkontrast, „hängend“): Bewegliche Zellen wie in 5. Die gleitenden Zellen bewegen sich mit dem verdickten Ende voran, das nachgeschleppte dünnere Ende löst sich gelegentlich vom Glas und hängt frei im Medium. Vereinzelt sind Zellen erkennbar, die dicker erscheinen und zeitweilig wie Diploformen aussehen. Am Ende der Szene setzt sich im linken Mittelfeld eine solche Zelle fest und wächst zum Filament auseinander. 1 B/s, Vergrößerung 161fach.

7. Einstellung (Phasenkontrast, „hängend“): Einzelne gleitende Zellen in geringerer Zeitraffung (6fach). 4 B/s, Vergrößerung 214fach.

Zellteilung

2 B/min

8. Einstellung (Phasenkontrast, „hängend“): Ein Filament teilt sich, eine Tochterzelle (Pfeil) bleibt fast unbeweglich liegen und beginnt sich erneut zu teilen. Daneben sind Bewegungen und Teilungen anderer Zellen zu sehen. Eine wandernde Zelle berührt das entstehende Filament, trennt sich aber wieder los und wandert weiter. Die sich teilende Zelle (erneuter Pfeil) reißt schließlich in zwei Tochterzellen auseinander. 2 B/min, Vergrößerung 161fach.

Koloniebildung

(Dauer des Vorgangs 4 Tage)

2 B/min

9. Einstellung (Phasenkontrast, „aufliegend“): Aus dem filtrierten Inoculum haben sich mehrere einzelne Zellen entwickelt, die am Glas entlanggleiten. 2 B/min, Vergrößerung 67,4fach.

10. Einstellung: Starke Vermehrung der Einzelzellen, am oberen Bildrand einige größere Schmutzpartikel, in der rechten Bildmitte fragliche bereits entstandene Kolonie. Durch Zusammentreffen vieler Zellen entsteht eine neue, schnell wachsende Kolonie (Pfeil), später bilden sich im Beobachtungsfeld noch weitere Kolonien. Auch diese Kolonien bewegen sich etwas am Glas. 2 B/min, Vergrößerung 67,4fach.

11. Einstellung: Eine Kolonie mit Einzelzellen in stärkerer Vergrößerung (167fach). 2 B/min.

12. Einstellung: Wie 11., schnellere Bildfolge (2 B/s). Sehr bewegliche Einzelzellen, Bewegung der Kolonie. Vergrößerung 167fach.

13. bis 15. Einstellung: Zahl und Beweglichkeit der Mycoplasmen nehmen ständig ab, am 4. Tag sind neben der Kolonie nur noch vereinzelte unbewegliche Zellen zu sehen. 2 B/s, Vergrößerung 167fach.

Literatur

- [1] ANDREWES, C. H., and F. V. WELCH: A motile organism of the pleuropneumonia group. *J. Path. Bact.* **58** (1946), 578—580.
- [2] BREDT, W.: Growth morphology of *Mycoplasma pneumoniae* strain FH on glass surface. *Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N. Y.)* **128** (1968), 338—340.
- [3] BREDT, W.: Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen zu Morphologie und Vermehrung von *Mycoplasma pneumoniae* an Glas. *Zbl. Bakt. I.*, Orig. **208** (1968), 549—562.
- [4] BREDT, W.: Motility and multiplication of *Mycoplasma pneumoniae*. *Path. Microbiol.* **32** (1968), 321—326.
- [5] BREDT, W.: Filamentous growth of some *Mycoplasma* species of man. *Experientia* **25** (1969), 1118—1119.
- [6] HAYFLICK, L. (ed.): *The Mycoplasmatales and the L-phase of bacteria*. North Holland Publishing Company, Amsterdam 1969.
- [7] HEUNERT, H. H.: Methoden zur Verhinderung von Schärfenschwankungen bei Zeitrafferaufnahmen von Agarkulturen. *Research Film* **4** (1962), 382—387.
- [8] NELSON, J. B., and M. J. LYONS: Phase-contrast and electron microscopy of murine strains of *Mycoplasma*. *J. Bact.* **90** (1965), 1750—1763.
- [9] SOMERSON, N. L., W. D. JAMES, B. E. WALLS and R. M. CHANOCK: Growth of *Mycoplasma pneumoniae* on a glass surface. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **143** (1967), 384—389.

Angaben zum Film

Das Filmdokument wurde 1970 zur Auswertung in Forschung und Hochschulunterricht veröffentlicht. Stummfilm, 16 mm, schwarzweiß, 67 m, 6 min (Vorführgeschw. 24 B/s).

Die Aufnahmen entstanden im Jahre 1969. Veröffentlichung aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg, Dr. W. BREDT, und dem Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen, Dr. K.-H. HÖFLING, H. H. HEUNERT.

Inhalt des Films

Der Film zeigt Wachstum und Bewegung von *Mycoplasma pneumoniae* in flüssigem Medium an einer Glasoberfläche. Nacheinander werden das Herauswachsen und -wandern einzelner Zellen aus kolonieähnlichen Zusammenballungen, die gleitenden Bewegungen der Einzelzellen und die Zweiteilung der *Mycoplasma*-Zellen dargestellt. Im letzten Teil werden die Entstehung neuer Kolonien aus Einzelzellen und die Alterungsvorgänge in der Kultur gezeigt.

Summary of the Film

The film shows growth and motility of *Mycoplasma pneumoniae*, growing in liquid medium on a glass surface. The growing of single cells out of colony-like clusters, the gliding motion of cells along the glass and the binary fission of the *Mycoplasma* cells are demonstrated. In the last scenes the formation of colonies by single cells and the aging of a culture are shown.

Résumé du Film

Le film montre le développement et les mouvements des *Mycoplasma pneumoniae* en milieu liquide, sur une surface de verre. On voit à tour de rôle grandir les cellules isolées, puis se détacher ces cellules des conglomerats à allure de colonies; on suit le déplacement sous forme de glissement des cellules isolées et la division en deux parties des cellules de *Mycoplasma*. La dernière partie du film montre la formation de nouvelles colonies de cellules isolées et le processus de vieillissement de la culture.