

ENCYCLOPAEDIA CINEMATOGRAPHICA

Editor: G. WOLF

E 1115/1967

Corynebacterium mirabile (Corynebacteriaceae) Vermehrung und Koloniebildung

Mit 2 Abbildungen

GÖTTINGEN 1970

INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM

Corynebacterium mirabile (Corynebacteriaceae)

Vermehrung und Koloniebildung¹

G. POETSCHKE, München

Allgemeine Vorbemerkungen

Toxonomie

Die beiden für diese Filme benutzten Stämme wurden 1950 aus dem männlichen Genitale isoliert. Beide Stämme sind bisher die einzigen geblieben, die die weiter unten beschriebenen Eigenschaften besitzen. Beide Stämme weisen morphologisch und färberisch die typischen Merkmale der Gattung *Corynebacterium* auf. Sie sind fakultativ anaerob, vermehren sich aber bei O₂-Anwesenheit wesentlich besser als bei O₂-Mangel oder -Abwesenheit.

Beide Stämme sind in ihrem biochemischen Verhalten und in ihrer Antigenstruktur identisch. Beide Stämme sind dadurch charakterisiert, daß sie auf oder in Nährböden, die Lipoproteine enthalten, ziemlich schnell geformte Stoffwechselprodukte bilden. Ihren sonstigen biochemischen Leistungen nach, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll, sind beide Stämme in keine der bekannten Spezies der Gattung *Corynebacterium* einzureihen. Sie werden daher als eine neue Spezies der Gattung *Corynebacterium* betrachtet und sollen einen eigenen Namen erhalten: *C. mirabile*. Die Eigenschaften dieser neuen Art sollen an anderem Ort eingehend beschrieben werden.

Morphologie der Stäbchen

Auf Nährböden, die kein Serum enthalten, ist das Wachstum schlecht. Beim Vorhandensein geringer Mengen von Serum (1—2%) wachsen beide Stämme besser und bilden sehr kleine, zarte, grau-gelbliche Kolonien. Diese Kolonien bestehen meist aus sehr kurzen, fast kokkoiden

¹ Angaben zum Film und Filminhalt (deutsch, englisch, französisch) s. S. 11.

Stäbchen. Gelegentlich, insbesondere bei nicht sehr lebhafter Multiplikation, kommt es zur Bildung längerer keulenförmiger Stäbchen, die Diphtheriebakterien sehr ähnlich sehen können. Auf Nährböden, die keine Lipoproteine enthalten, werden von beiden Stämmen keine geformten Stoffwechselprodukte gebildet. Reine Stäbchenkolonien entstehen ferner beim Zusatz folgender Substanzen zu dem Nähragar:

- a. Ultrafiltrat von Serum (proteinfrei) bis 20%. Höhere Konzentrationen wurden nicht geprüft. Das Filtrat verbessert auf proteinfreien Nährböden das Wachstum.
- b. Hühnereiklar 0,1—10%; höhere Konzentrationen wurden nicht untersucht.

Stäbchenkolonien mit nur wenigen geformten Stoffwechselprodukten entstanden beim Zusatz von Serumalbumin und Gammaglobulin in Konzentration von 0,01—0,1% (w/v).

Bildung geformter Stoffwechselprodukte

Die Multiplikation der Stäbchen wird durch niedrige Konzentrationen von Serum (1—2%, je nach Serumart und Lipoidgehalt) gefördert. Mit zunehmender Serumkonzentration tritt, besonders unter O₂-Mangel, eine temporäre Hemmung der Multiplikation auf. Bei einer Temperatur von 37° entstehen zuerst zwei Arten geformter Stoffwechselprodukte:

1. Myelinfiguren

In unmittelbarem Kontakt mit den Stäbchen bilden sich sehr zarte Blasen und Schläuche, die wir mit PARTRIDGE und KLIENECKER [1] als „Myelinfiguren“ bezeichnen wollen. Im Verlauf der Bebrütung nehmen sie an Umfang und Kontrast zu und können einen Durchmesser bis 30 µm erreichen. Wenn wenig Raum zwischen Agaroberfläche und Deckglas zur Verfügung steht, sind die Blasen mehr ausgebreitet und wirken wie flache, mehr oder minder dunkle Scheiben mit unregelmäßigem Umriß. Ist die Flüssigkeitsschicht höher, sind die Blasen abgerundeter, kleiner und regelmäßiger begrenzt. Die Wand der Myelinfiguren muß sehr dünn sein. Feine Schläuche sieht man bisweilen sich hin- und herbewegen, wohl infolge der Brownschen Molekularbewegung des Mediums.

An Stellen, an denen der Agar durch Schrumpfung eine napfartige Vertiefung während der Bebrütung gebildet hat, werden die Myelinfiguren zu langen Schläuchen ausgezogen, die in einer Blase endigen können.

Die Myelinfiguren bestehen nicht aus Bakterienmaterial, denn mit fluoreszeïn-markierten Antikörpern gegen die Stäbchen färben sich nur die Keime selbst, nicht aber die Blasen an. Die Myelinfiguren entstammen den Lipoproteinen des Nährbodens. Sie lassen sich mit Farbstoffen anfärben, die für Proteine eine starke Affinität haben, wie Methylenblau, Kristallviolett, Fuchsin. In noch stärkerem Maße werden

sie jedoch von lipoidaffinen Farbstoffen, wie Nilblausulfat, Brillantkresylblau und Victoriablau, angefärbt. Die Myelinfiguren sind in Fettlösungsmitteln und Gallensalzlösungen sehr leicht löslich.

Myelinfiguren entstehen bei Anwesenheit der Seren folgender Spezies: Mensch, Pferd, Rind, Schaf, Schwein, Kaninchen, Ratte, Meerschweinchen und Huhn, ferner bei Anwesenheit von Hühnerembryonal-Extrakt. Seren anderer Tierarten wurden nicht untersucht. Meerschweinchen-serum führt meist nur zur Ausbildung weniger und sehr zarter Blasen.

Die zur Bildung von Myelinfiguren nötige unterste Serumkonzentration liegt je nach Spezies, Lipoidgehalt und Alter der Serumprobe zwischen 2,0 und 5,0%. Versuche mit Serumfraktionen zeigen, daß der Lipoidgehalt der entscheidende Faktor ist (POETSCHKE und KILLISCH [3]).

2. Sphärokristalle von Cholesterinestern

Auf Nährböden, die Serum oder Lipoproteine enthalten, entstehen während der Bebrütung gelblich gefärbte, stark lichtbrechende, runde Körper an oder zwischen den Stäbchen. Bei phasenkontrastmikroskopischen Beobachtungen erscheinen ihre ersten Stadien als kleine dunkle Granula, die unmittelbar an oder auf den Stäbchen liegen. Mit zunehmender Bebrütung werden sie größer und zahlreicher, ihr Zentrum hellt sich auf, schließlich erscheint der ganze runde Körper hell. Im Polarisationsmikroskop erweisen sich diese runden Körper als doppelbrechend und zeigen ein deutliches Malteserkreuz; sie sind also Sphärokristalle. Wie die Myelinfiguren sind die Sphärokristalle in Fettlösungsmitteln sehr gut löslich. Hebt man das Deckglas einer Mikrokultur, die viele derartige Sphärokristalle enthält, ab und führt die für Cholesterin und Cholesterinester charakteristische Liebermann-Burchard-Reaktion durch, indem man das Deckglas auf einen Tropfen des Reaktionsgemisches auf einen Objektträger legt, so färbt sich jede Kolonie dunkelblau an.

Bei längerer Bebrütung entstehen in der Umgebung größerer Kolonien auf Nährböden, die Serum enthalten, dunkle Punkte, die schließlich zu kleinen Sphärokristallen heranwachsen.

Mit fortschreitender Bebrütung werden die Sphärokristalle meist wieder abgebaut, am schnellsten im aeroben Bereich der Mikrokulturen und im Zentrum der Kolonien.

3. Kristalle in Tafel- und Nadelform

Die dritte Art geformter Stoffwechselprodukte, die man fast regelmäßig beobachten kann, sind verschieden geformte Kristalle. Diese Kristalle treten im allgemeinen später auf als die Myelinfiguren und Sphärokristalle. Kinematographische Beobachtungen zeigen, daß die Kristalle meist aufzutreten beginnen, wenn die Sphärokristalle abgebaut werden. Die am häufigsten vorkommenden Kristalle haben die typische Form von Cholesterintafeln, sind in den Lösungsmitteln löslich, in denen sich Cholesterin löst (Chloroform, Äther, Eisessig) und zeigen unter dem

Polarisationsmikroskop das typische Verhalten von Cholesterintafeln. Die Frage, ob die verschiedenen Kristallformen als verschiedenartige Ausbildungen von Cholesterinkristallen gedeutet werden können oder ob Kristalle verschiedener Stoffe vorkommen, konnte noch nicht geklärt werden. Hier sei nur darauf hingewiesen, daß ein Teil von ihnen Nadeln von Fettsäuren sein könnten. Die von den Keimen gebildeten Esterasen vermögen auch Seifen (z. B. Tributyrin) und andere Ester (z. B. Polyoxyäthylenmonolaureat-sorbitan = Tween 20) zu spalten (siehe unten). Dabei treten um die Bakterien Büschel von Fettsäurenadeln auf.

4. Fadenförmige Strukturen

Die vierte Art geformter Stoffwechselprodukte sind fadenförmige Gebilde. Sie konnten bisher nur selten beobachtet werden. Sie scheinen nur in Nährböden aufzutreten, die Serum enthalten. Die genaueren Bedingungen ihres Entstehens konnten noch nicht ermittelt und ihre Natur nicht aufgeklärt werden.

Temperaturempfindlichkeit

Zwei der geformten Stoffwechselprodukte, Myelinfiguren und Sphärökristalle, werden auch von Keimen gebildet, die durch physikalische oder chemische Einflüsse geschädigt wurden. Bei der Inaktivierung durch Hitze war es gleich, ob die Keimsuspensionen 10—20 Min. auf $+60^{\circ}\text{C}$ oder 5—10 Min. auf $+100^{\circ}\text{C}$ erhitzt wurden. Auf Nährböden, die 1,0% Sulfanilyl-Carbamid-Na (Euvernil-Heyden) enthalten, wird ebenfalls die Multiplikation der Stäbchen unterbunden, die Bildung von Myelinfiguren und Sphärökristallen erfolgt jedoch wie bei den „lebenden“ Kontrollen. Formalin (0,4% im Medium) verhindert neben der Multiplikation auch die Bildung der beiden geformten Stoffwechselprodukte. Im Gegensatz zu den eben geschilderten Ergebnissen treten der Abbau von Cholesterinester-Sphärökristallen und die Ablagerung von Kristallen, insbesondere von Cholesterintafeln, nur auf, wenn die Keime so intakt sind, daß auch die Multiplikation nicht gehemmt oder zerstört worden ist.

Einfluß von Serumfraktionen

Wegen der komplexen Natur des Serums schien es uns wichtig, jene Fraktionen des Serums zu ermitteln, deren Vorhandensein für die Bildung der verschiedenen geformten Stoffwechselprodukte von Bedeutung ist.

Es zeigte sich, daß bei Anwesenheit von Albumin und Gammaglobulin im Nährboden die Bildung der geformten Stoffwechselprodukte nicht auftritt. Diejenigen Serumfraktionen, die viel Lipide enthalten, insbesondere Alpha- und Beta-Lipoproteine, führen jedoch zu einer starken Bildung dieser Elemente (POETSCHKE und KILLISCH [3]).

Esteraseaktivität

Da die Cholesterinester-Sphärökristalle, die während der Bebrütung abgelagert werden, oft bei weiterer Inkubierung wieder verschwinden, während freies Cholesterin in Form von Kristalltafeln zurückbleibt, mußte angenommen werden, daß *C. mirabile* Cholesterinesterasen und möglicherweise andere Esterasen besitzt.

Das Vorkommen von Cholesterinesterasen war von UEHLEKE [4] bereits nachgewiesen worden. Es wurde nun untersucht, ob auch andere Ester gespalten werden. Als gut wasserlöslich boten sich die Fettsäureester des Polyoxyäthylen-Sorbitans (Tween 20—80) an. Die Ester-spaltung wurde durch Titration der freigesetzten Säuren bestimmt.

Auch das Filtrat und das Autolysat der Keime zeigten eine Esteraktivität gegenüber der Tweenen, demonstriert am Tween 20.

Die Aktivität der Esterasen ist temperaturabhängig und hat bei +37° C das Optimum.

Auswertung der Filme

Die Auswertung der drei Filme über *Corynebacterium mirabile* umfaßte die Multiplikation und das Wachstum der Bakterien, die Größenzunahme der Blasen der Myelinfiguren und die Größenzunahme von Kristallen.

Es ist klar, daß das Volumen der Parameter ist, der am besten die Massenzunahme der verschiedenen gemessenen Gebilde wiedergibt. Bei wachsenden und sich vermehrenden Keimen ist das Volumen der beste Ausdruck für die Summe der Syntheseleistungen. Das Volumen der photographierten Gebilde ist jedoch nur dann einigermaßen exakt zu erschließen, wenn wir aus der Form der photographierten Gegenstände auf ihre Tiefe schließen können. Das ist bei einigermaßen regelmäßig gebauten Bakterien durchaus möglich, da sie entweder die Form einer Kugel oder eines Zylinders haben, deren Durchmesser aus dem photographischen Bild leicht geschlossen werden kann.

Es hat sich gezeigt, daß bei Mikrokolonien, in denen alle Keime in einer Schicht liegen, die Summe der Oberflächen der photographischen Bilder und die Summe der dazugehörigen Volumina der Keime parallele Kurven bilden (POETSCHKE [2]).

Es genügt also, die Summe der Oberflächen als Ausdruck der Syntheseleistung zu wählen, wenn die oben genannten Voraussetzungen erfüllt sind. Dies ist bei der messenden Auswertung dieser Filme geschehen.

Da im allgemeinen der zur Verfügung stehende Raum zwischen Agaroberfläche und Deckglas bei den benutzten Mikrokulturen im gesamten Präparat nur unwesentliche Unterschiede haben dürfte, insbesondere nicht innerhalb eines mikroskopischen Gesichtsfeldes, ist auch für die anderen

gemessenen Gebilde die Fläche des photographischen Bildes annäherungsweise ein ausreichend exakter Ausdruck des Volumens.

Bei der Auswertung der ausgemessenen Vorgänge wurde der Logarithmus der Fläche der photographischen Bilder gegen die Zeit aufgetragen. Hierbei entstehen häufig gerade Linien. Man spricht dann von linearem Wachstum. Mathematisch betrachtet läßt sich der Wachstums- oder Vermehrungsvorgang dann als eine Exponentialfunktion ausdrücken. Auch bei der Messung der Vermehrung von Bakterien mit Hilfe anderer Methoden bekommt man im Idealfall derartige gerade Linien. Allerdings liegen die Meßpunkte wegen der größeren Fehlerbreite der anderen Methoden kaum jemals so dicht an der geraden Wachstumskurve wie bei der Ausmessung gefilmter Multiplikationsvorgänge.

Filmbeschreibung¹

4 B/min

Die Multiplikation wird hier einheitlich auf einem Nähragar mit 2% Pferdeserum gezeigt. Die Bebrütungstemperatur ist bei der ersten Einstellung +35° C, bei den folgenden zwei +36° C.

Die erste Einstellung zeigt die Multiplikation und Koloniebildung bei einer relativ niedrigen Vergrößerung. Es wurde ein Trockensystem von 40facher Eigenvergrößerung benutzt. Das Inokulum besteht aus sechs kleinen Keimgruppen und einer etwas größeren, die im Verlauf des Wachstums zu einer einzigen großen Kolonie verschmelzen. Die erste Einstellung ist ausgemessen worden, wobei sämtliche im Zentrum des Bildes liegenden Einzelkolonien und die konfluierende Großkolonie erfaßt worden sind. Abb. 1 zeigt graphisch diesen Vermehrungsvorgang. Wir sehen, daß im Verlauf der ersten 200 Minuten, ohne eine vorausgehende Latenz, ein steiles lineares Wachstum erfolgt, das zwischen der 200sten und 400sten Minute in ein wesentlich weniger schnelles, aber auch lineares Wachstum übergeht. Die Verlangsamung des Wachstums zwischen der 200sten und 300sten Minute sehen wir bei vielen der ausgemessenen Vermehrungsvorgänge dieses Keimes. Auch von anderen Keimen kennen wir diesen Vorgang, der sehr charakteristisch ist, aber je nach Nährboden und Nährbodenanspruch und den Gegebenheiten des einzelnen Präparates mehr oder minder früh aus dem steilen logarithmischen Wachstum in einen mehr stationären Zustand übergeht. Diese Verlangsamung der Multiplikation und schließlich ihr vollständiges Ruhen beruht einerseits auf einer Erschöpfung der Nährbodenfaktoren und andererseits auf der Ansammlung von Stoffwechselprodukten, die auf die Multiplikation hemmend wirken.

¹ Die *Kursiv*-Überschrift entspricht dem Zwischentitel im Film.

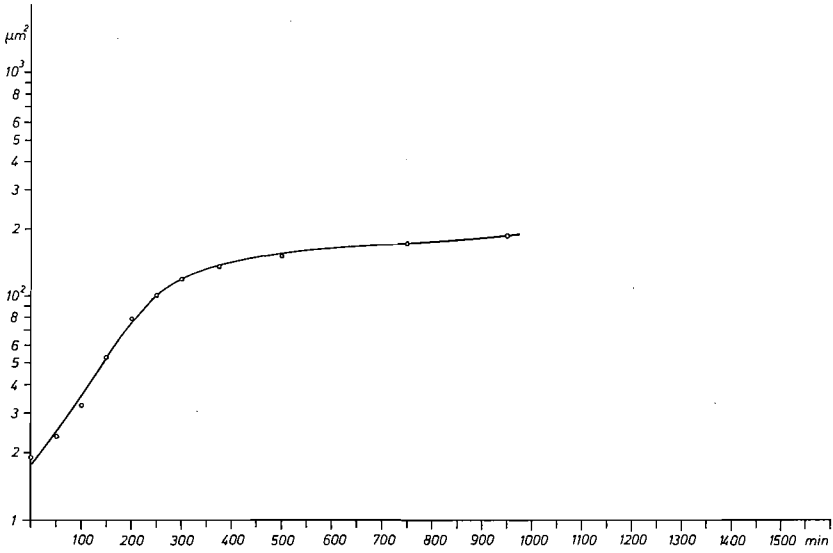


Abb. 1. Größenzunahme von Mikrokolonien (Gesamtfläche)

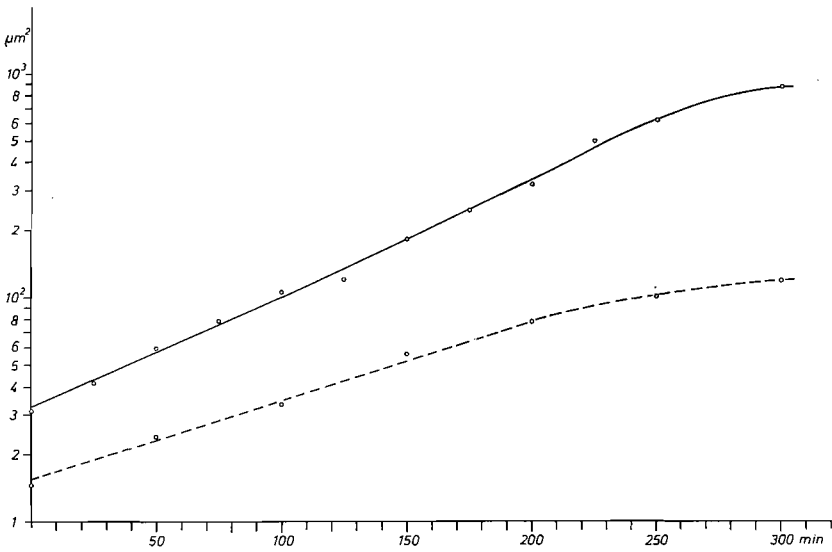


Abb. 2. Größenzunahme von Mikrokolonien (Gesamtfläche)

Vergr.: 94,5fach; Aufn.-Frequenz: 4 B/min; Dauer des Vorgangs: 4 Std. 46 min.

Die zweite und dritte Einstellung sind bei stärkerer Vergrößerung unter Benutzung einer hundertfachen Ölimmersion gefilmt. Die Einzelheiten des Multiplikationsvorganges sind daher wesentlich besser zu sehen. Wenn man ein einzelnes Stäbchen ins Auge faßt, so wird man beobachten, daß es etwas anschwillt und vor allem in der Länge wächst, bis eine Zweiteilung erfolgt. Sofort im Anschluß an die Zweiteilung machen beide Teilhälften eine schnelle Bewegung, an deren Ende beide Teilhälften ein V bilden oder fast parallel liegen.

Das Inokulum der zweiten Szene besteht aus zehn verschieden großen Ansammlungen von Stäbchen, die kleinsten zählen nur ein oder zwei Stäbchen. Im Verlauf der Multiplikation kommt es zum Konfluieren der Kolonien. Aus der im Mittelfeld rechts gelegenen größeren Kolonie schießt plötzlich eine Art Blase hervor. Verfolgt man die Multiplikation der Stäbchen im Versuch 21 messend, so ergibt sich wiederum — und zwar bis je zur 250sten Minute — eine lineare Vermehrung (s. Abb. 2). Bei der dritten Szene besteht das Inokulum aus vier kleinen Bakteriengruppen, von denen die rechten drei während der Multiplikation rasch zu einer Kolonie zusammenfließen. Im Verlauf des Streifens wachsen von der linken und oberen Bildseite noch Kolonien hinein, die am Anfang nicht oder nur wenig sichtbar waren.

Vergr.: 200fach; Aufn.-Frequenz: 4 B/min; Dauer des Vorgangs: 2. Aufn. 4 Std. 21 min; 3. Aufn. 9 Std. 50 min.

Literatur

- [1] PARTRIDGE, S. M., und EMMY KLIENEBERGER: J. Path. Bact. 52 (1941), 219.
- [2] POETSCHKE, G.: Path. Microbiol. 24 (1961), 1019.
- [3] POETSCHKE, G., und LIESELOTTE KILLISCH: Behringwerk-Mitteilungen Heft 42, 1962.
- [4] UEHLEKE, H.: Naturwissensch. 15 (1959), 77.

Angaben zum Film

Der Film ist ein Forschungsdokument und wurde 1967 zur Auswertung in Forschung und Hochschulunterricht veröffentlicht. Stummfilm, 16 mm, schwarzweiß, 40 m, 4 min (Vorführgeschw. 24 B/s).

Die Aufnahmen entstanden im Jahre 1964. Veröffentlichung aus dem Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen (Direktor: Prof. Dr.-Ing. G. WOLF), Sachbearbeitung: Dr. K.-H. HÖFLING, Aufnahme: H. H. HEUNERT. Wissenschaftliche Leitung: Priv.-Doz. Dr. G. POETSCHKE, München.

Inhalt des Films

Corynebacterium mirabile, eine neue Spezies, wurde aus dem männlichen Genitale des Menschen isoliert. Es handelt sich um stäbchenförmige Bakterien, die fakultativ anaerob sind. Auf proteinfreien Nährböden bilden sich reine Stäbchenkolonien mit nur wenig geformten Stoffwechselprodukten.

Film E 1115 zeigt bei Bebrütungstemperaturen von 35—36° C die Vermehrung und Koloniebildung mit nur geringer Ausbildung geformter Stoffwechselprodukte.

Summary of the Film

Corynebacterium mirabile, a new species, was isolated from the genitary tract of human males. They are rod shaped bacteria which are facultatively anaerobic. On protein-free media only rods are formed associated with a minimum amount of formed products.

At incubation temperatures of 35—36 centigrades film E 1115 shows growth and colony formation of rods which only minimum formation of formed metabolic products.

Résumé du Film

Le *Corynebacterium mirabile*, une espèce nouveau, a été isolé des parties génitales de l'homme. Il s'agit des bactéries en forme de bâtonnets qui peuvent être anaérobies. Sur un sérum sans protéine des colonies pures de bâtonnets avec des produits du métabolisme à peine formés se développent.

Le film E 1115 présente la multiplication et la formation des colonies avec un peu de produits du métabolisme formés aux températures d'incubation de 35—36° C.