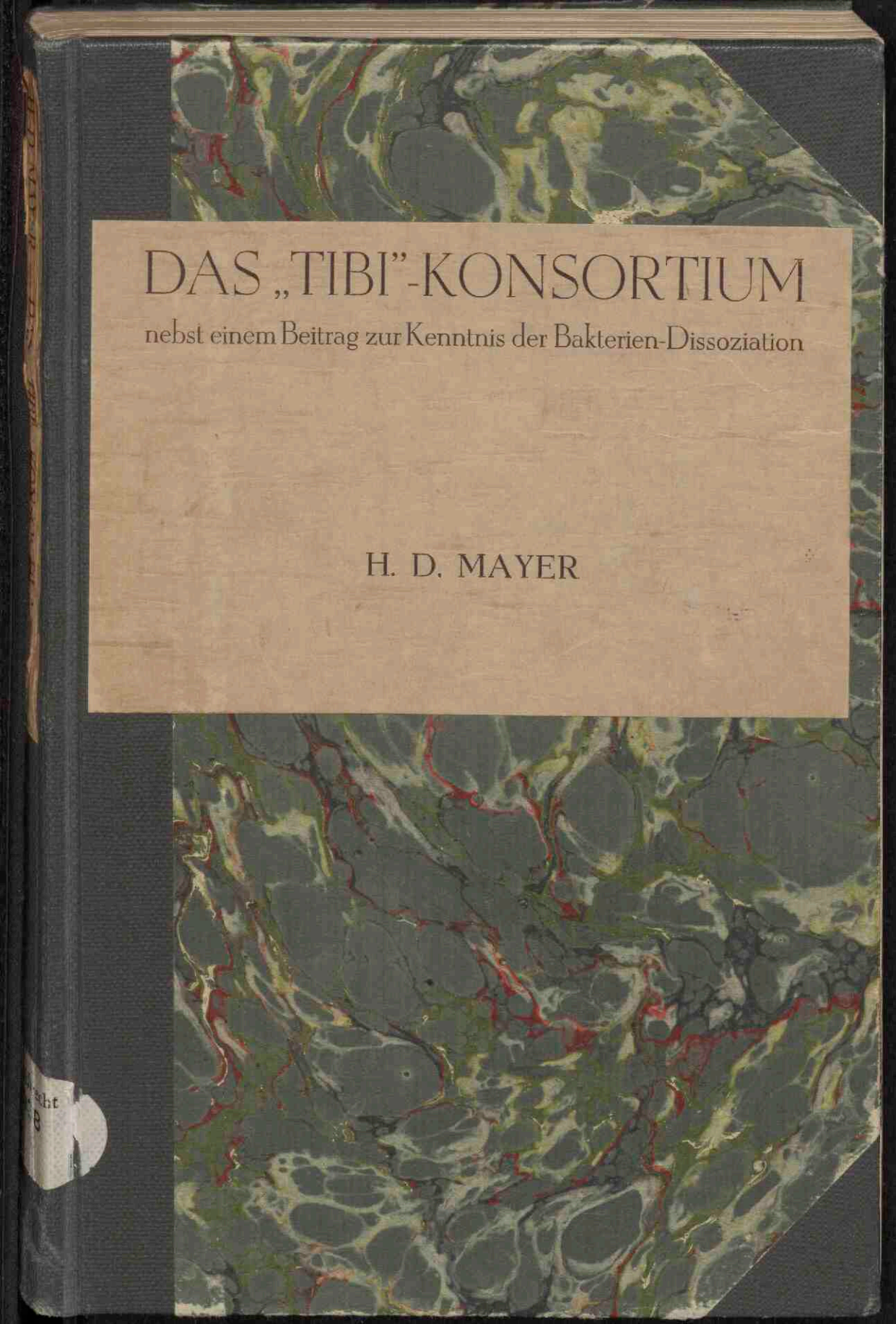




# **Das "Tibi"-Konsortium nebst einem Beitrag zur Kenntnis der Bakterien-Dissoziation**

<https://hdl.handle.net/1874/324320>

The image shows the front cover of a book. The cover is bound in dark grey or black cloth. A large, rectangular piece of light-colored, textured paper is pasted onto the cover, serving as a title slip. The slip contains the title and author's name in black ink. The background of the cover, visible around the slip and at the corners, is a marbled paper with a pattern of swirling green, red, and white lines on a dark grey background. The spine of the book is visible on the left side, showing some wear and a small white label.

# DAS „TIBI“-KONSORTIUM

nebst einem Beitrag zur Kenntnis der Bakterien-Dissoziation

H. D. MAYER

ht  
B









DAS „TIBI“-KONSORTIUM  
nebst einem Beitrag zur Kenntnis der Bakterien-Dissoziation

RIJKSUNIVERSITEIT UTRECHT



0361 3837

*Cl. qu. 192, 1938*

# DAS „TIBI“-KONSORTIUM

nebst einem Beitrag zur Kenntnis der Bakterien-Dissoziation

PROEFSCHRIFT, TER VERKRIJGING  
VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN  
DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN DE  
RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT,  
OPGEZAG VANDEN RECTOR MAGNI-  
FICUS DR. J. BOEKE, HOOGLEERAAR  
IN DE FACULTEIT DER GENEES-  
KUNDE, VOLGENS BESLUIT VAN  
DEN SENAAAT DER UNIVERSITEIT  
TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE  
FACULTEIT DER WIS- EN NATUUR-  
KUNDE TE VERDEDIGEN OP MAAN-  
DAG 11 APRIL 1938, DES NAMIDDAGS  
TE 4 UUR, DOOR

HERMAN DIRK MAYER

GEBOREN TE HAZERSWOUDE

DRUK NAAMLooZE VENNOOTSCHAP W. D. MEINEMA — DELFT

BIBLIOTHEEK DER  
RIJKSUNIVERSITEIT  
UTRECHT.



AAN DE NAGEDACHTENIS VAN MIJN VADER.  
AAN DE NAGEDACHTENIS VAN MEVROUW  
E. M. CANTER CREMERS-VAN HOIJTEMA.  
AAN MIJN MOEDER.





## VOORWOORD.

Bij het beëindigen van dit proefschrift neem ik gaarne de gelegenheid te baat allen, die mij bij mijn studie hebben geholpen, daarvoor mijn dank te brengen.

Wel in de eerste plaats gaan daarbij mijn gedachten uit naar U, Hooggeleerde KLUYVER. Met zeer veel genoegen zal ik steeds terugdenken aan den Delftschen tijd, waarin ik het voorrecht had onder Uw enthousiaste en zoo stimuleerende leiding dit proefschrift te mogen bewerken.

Dat tenslotte de microbiologie voor mij wel het meest gewaardeerde terrein van studie is geworden, is voor een groot deel te danken aan het feit, dat ik juist van U daarbij voorlichting heb ontvangen.

Het is heel moeilijk onder woorden te brengen, hoe dankbaar ik U ben voor den krachtigen steun en voor de groote belangstelling, die ik steeds van U mocht ondervinden. Eenmaal uit de Delftsche sfeer zal ik pas goed kunnen beseffen van hoeveel waarde de tijd, waarin U mij met raad en daad hebt willen bijstaan, voor mij is geweest.

Evenzeer zal ik steeds erkentelijk blijven voor de gastvrijheid, welke ik meermalen van Mevrouw KLUYVER en U heb ondervonden.

U, Hooggeleeraren en Lectoren in de faculteit der Wis- en Natuurkunde, die tot mijn opleiding hebben bijgedragen, ben ik hiervoor ten zeerste dank verschuldigd. Aan de wijze, waarop door U de veelzijdige en belangwekkende stof wordt gedoceerd, dank ik de groote voldoening, die ik in de biologische studie heb gevonden.

In het bijzonder gedenk ik hier wijlen mijn leermeesters WENT en NIERSTRASS, die in mijn dankbare herinnering zullen blijven voortleven.

Hooggeleerde KONINGSBERGER, Hooggeachte Promotor. Het stemt mij tot groote dankbaarheid, dat U zich, hoewel dit proefschrift buiten U om is bewerkt, bereid verklaard hebt als mijn promotor op te treden.

Voor de groote medewerking, die ik daarbij van U heb ondervonden, ben ik U in hooge mate erkentelijk.

Hooggeleerde HONING, U ben ik zeer verplicht voor Uw kritiek betreffende het tweede gedeelte van mijn proefschrift.

Zeergeleerde VAN KONIJNENBURG, U waart zoo welwillend mij in staat

te stellen dit proefschrift te voltooien. Deze tegemoetkoming zal ik steeds op hoogen prijs stellen.

Zeer geleerde KINGMA BOLTJES, waarde PERQUIN, voor de mij betoonde hulp en de fraaie fotografieën, die U voor mij hebt willen maken, ben ik U zeer dankbaar.

Waarde ROTTIER, GREVER en SOETERS, ook U dank ik voor den raad en de hulp, die ik steeds van U mocht ontvangen.

Tevens wil ik hier gaarne allen laboranten mijn besten dank betuigen voor den prettigen en vriendschappelijken omgang.

Waarde BRETTSCHEIDER en Mejuffrouw HOETTE, ook U ben ik zeer erkentelijk voor de mij betoonde hulp.

Hoewel het mij niet mogelijk is allen te noemen, wier vriendschap ik in mijn studietijd mocht ondervinden, wil ik toch in het bijzonder U, beste THOMAS, DAMSTÉ en GIESBERGER, daarvoor danken. Aan den tijd, dien wij als studievrienden samen hebben doorgebracht, zal ik steeds een mooie herinnering bewaren.

Tenslotte rest mij nog mijn waardeering uit te spreken voor de medewerking en hulpvaardigheid, die ik van het geheele personeel van het Laboratorium voor Microbiologie te Delft heb ondervonden.

Ik dank hen allen zeer daarvoor en in het bijzonder U, waarde VEENHOF voor de fraaie, door U gemaakte fotografieën. Ook U, waarde DE BOUTER, wil ik danken voor het keurige teekenswerk.

---

# INHALT.

EINLEITUNG . . . . .	13
----------------------	----

## ERSTER TEIL.

### DAS TIBI-KONSORTIUM.

#### KAPITEL I.

<i>Historische Übersicht.</i> . . . . .	17
---	----

#### KAPITEL II.

<i>Isolierung von im Tibi-Rohmaterial vorhandenen Mikroorganismen und Auffindung der dieses Konsortium zusammensetzenden Symbionten.</i> . . . . .	21
--	----

§ 1. Ausgangsmaterial und Methode . . . . .	21
---	----

§ 2. Die Hefearten . . . . .	21
------------------------------	----

§ 3. Die aus den Tibi-Proben isolierten Bakterienarten . . . . .	23
--	----

#### KAPITEL III.

<i>Eigenschaften des stäbchenförmigen Tibi-Bakteriums und seine Einreihung in das System.</i> . . . . .	27
---	----

§ 1. Ein gemeinschaftliches Merkmal des Tibi-Bakteriums und <i>Betacoccus arabinosaceus</i> . . . . .	27
---	----

§ 2. Die bei dem Tibi-Bakterium eintretende Dissoziation. . . . .	29
---	----

§ 3. Zellmorphologie des Tibi-Bakteriums . . . . .	31
--	----

§ 4. Stoffwechsel und andere Eigenschaften des Tibi-Bakteriums . . . . .	32
--	----

§ 5. Einreihung des Tibi-Bakteriums in das System. . . . .	34
--	----

#### KAPITEL IV.

<i>Einfluss der Kulturbedingungen auf die Konsistenz des Bakterienwandstoffes und die Synthese des Tibi-Konsortiums.</i> . . . . .	36
--	----

§ 1. Einleitung . . . . .	36
---------------------------	----

§ 2. Die Abhängigkeit der Konsistenz des Bakterienwandstoffes von den Kulturbedingungen . . . . .	37
---	----

§ 3. Synthese des Konsortiums aus den Reinkulturen der isolierten Hefe und des Tibi-Bakteriums . . . . .	40
--	----

#### KAPITEL V.

<i>Mikroskopische Untersuchung des Tibi-Konsortiums und seine Identität mit der „Ginger Beer Plant“.</i> . . . . .	43
--	----

§ 1. Mikroskopische Untersuchung der Tibi-Klumpchen. . . . .	43
--	----

§ 2. Identität des Tibi-Konsortiums mit der „Ginger Beer Plant“ . . . . .	46
---	----



## KAPITEL VI.

<i>Die Kapselbildung von Betabacterium vermiforme in Reinkultur</i> . . . . .	48
§ 1. Mikroskopische Beobachtung bezüglich der Erscheinungsformen des Bakteriums in der Reinkultur . . . . .	48
§ 2. Die Bereitung hefefreier Körner und deren Eigenschaften . . . . .	52
§ 3. Mikroskopische Beobachtungen über die Art der Kapselentwicklung . . . . .	54

## KAPITEL VII.

<i>Die gegenseitige Beeinflussung der Symbionten im Konsortium</i> . . . . .	61
§ 1. Einleitung . . . . .	61
§ 2. Der günstige Einfluss der Hefe auf die Entwicklung von <i>Betabacterium vermiforme</i> unter verschiedenen Bedingungen . . . . .	62
§ 3. Der Einfluss von Kohlensäure auf die Entwicklung von <i>Betabacterium vermiforme</i> in Reinkultur . . . . .	63
§ 4. Die Bedeutung der Hefe für die Stickstoffernährung von <i>Betabacterium vermiforme</i> . . . . .	70
§ 5. Begünstigt <i>Betabacterium vermiforme</i> die Entwicklung der Hefe? . . . . .	73
§ 6. Über das Wesen der Tibi-Symbiose . . . . .	74

## KAPITEL VIII.

<i>Der Wandstoff von Betabacterium vermiforme und dessen Eigenschaften</i> . . . . .	77
§ 1. Die Bereitung des Wandstoffes in Pulverform . . . . .	77
§ 2. Einige Eigenschaften des Wandstoffpräparates . . . . .	78
§ 3. Über die Natur des Wandstoffes . . . . .	80

## KAPITEL IX.

<i>Bakterielle Hydrolyse des Tibi-Dextrans</i> . . . . .	83
§ 1. Isolierung eines dextran hydrolysierenden Bakteriums. . . . .	83
§ 2. Eigenschaften und Identifizierung der isolierten Bakterienart . . . . .	84
§ 3. Hydrolyse des gereinigten Dextranpräparates durch <i>Bacillus palustris</i> . . . . .	87
§ 4. Einige weitere Beobachtungen über die bakterielle Hydrolyse des Tibi-Dextrans . . . . .	89

---

## ZWEITER TEIL.

### DIE DISSOZIATION VON *BETABACTERIUM VERMIFORME*, NEBST EINIGEN ALLGEMEINEN BETRACHTUNGEN ÜBER DAS DISSOZIATIONSPHÄNOMEN.

#### KAPITEL X.

<i>Kurze Übersicht über das Phänomen und das Wesen der Bakterien-Dissoziation</i> . . . . .	95
§ 1. Einführende Bemerkungen . . . . .	95
§ 2. Kurze Charakteristik von der Erscheinung der Bakte- rien-Dissoziation . . . . .	97
§ 3. Besprechung der verschiedenen Ansichten über das Wesen des Dissoziationsphänomens . . . . .	107

#### KAPITEL XI.

<i>Eigene Beobachtungen über die Dissoziation von <i>Betabac- terium vermiforme</i></i> . . . . .	125
§ 1. Einleitung . . . . .	125
§ 2. Die Dissoziation von <i>Betabacterium vermiforme</i> bei der Züchtung auf festen Nährmedien . . . . .	125
§ 3. Die Dissoziation von <i>Betabacterium vermiforme</i> bei der Züchtung in flüssigen Nährmedien . . . . .	129
§ 4. Isolierung einer neuen, wandstoffbildenden R-Variante . . . . .	133
§ 5. Nähere Beobachtungen über die in Plattenkulturen regel- mässig auftretenden, nicht-wandstoffbildenden O- und S-Varianten. . . . .	135
§ 6. Eine aus dem S-Typus erhaltene nicht-wandstoffbilden- de, rauhe Variante. . . . .	138
§ 7. Der Zusammenhang zwischen Kolonie- und Zellmor- phologie bei den aufgetretenen Varianten . . . . .	141
§ 8. Besprechung der Resultate . . . . .	144

#### KAPITEL XII.

<i>Betrachtungen über das Wesen der Dissoziation im Lichte der neueren Untersuchungen über die Genmutation bei höheren Lebensformen.</i> . . . . .	156
§ 1. Bemerkungen zur Frage ob der Begriff der Genmuta- tion sich auf Bakterien anwenden lässt . . . . .	156
§ 2. Einige rezente Beobachtungen über spontane labile Genmutation bei höheren Lebensformen. . . . .	161
§ 3. Experimentelle Auslösung von Mutation und Rückmu- tation . . . . .	164



§ 4. Übereinstimmendes in den Erscheinungen, die einerseits bei der Genmutation bei höheren Lebensformen, andererseits bei der Dissoziation von Bakterien auftreten . . . . .	168
§ 5. Deutung der wichtigsten Erscheinungen der Bakterien-Dissoziation auf mutativer Basis. . . . .	173

SCHLUSSBETRACHTUNG ÜBER DAS WESEN DER DISSOZIATION . . . . .	181
--	-----

---

## EINLEITUNG.

Unter „Tibi“ wird eine körnige Masse verstanden, welche aus einem Gemisch (Konsortium) einer Hefe und eines Bakteriums besteht.

Im Jahre 1934 veröffentlichte Dr. S. BLUMER eine Abhandlung unter dem Titel „Untersuchungen über die Tibi-Gärung“.

Anlässlich dieser Veröffentlichung ersuchte Professor KLUYVER, unter dessen Leitung diese Dissertation bearbeitet ist, genannten Forscher ihm eine kleine Menge dieses in seiner Mitteilung beschriebenen Tibi-Materials für eine nähere Untersuchung überlassen zu wollen. Dr. BLUMER war so freundlich dieser Bitte nachzukommen. Ein Jahr später war Fr. Dr. B. PORCHET in Lausanne, die inzwischen ebenfalls eine Studie über den „Tibi“ veröffentlichte (1934), so liebenswürdig mir auf meine Anfrage eine Probe Tibi-Körner zu senden.

Die von mir empfangenen Tibi-Körner bestanden aus gelatinösen, halb-durchsichtigen bis glasigen Klümpchen, deren Grösse zwischen einer Erbse und einer Haselnuss schwankte. Sie waren unregelmässig von Form und hatten eine gefurchte und gelappte Oberfläche.

In frischem, gesundem Zustand besteht das Klümpchen aus einer festen, ziemlich harten Substanz, deren Konsistenz einigermaßen an gekochten Reis erinnert, obwohl die Masse beim Auseinanderdrücken zwischen den Fingern sich etwas spröde anfühlt. Lässt man das Produkt einige Zeit eintrocknen, dann wird die Konsistenz elastischer.

Dieses merkwürdige Material, welches im Jahre 1890 in Paris bereits unter dem Namen „graines vivantes“ bekannt war, wurde zur Zeit der BLUMER'schen Veröffentlichung bereits einige Jahre von einem Teil der Schweizer Bevölkerung zur Bereitung eines süss-sauren, moussierenden Hausgetränkes gebraucht. Hierzu lässt man eine 15% Rohrzuckerlösung, welcher man einige frische oder getrocknete Feigen, Trauben und etwas Zitronensaft zufügt, unter dem Einfluss einer Anzahl dieser Klümpchen bei einer Temperatur von 25° C gären. Nach etwa 2 bis 5 Tagen wird die noch nicht ganz ausgegorene Flüssigkeit abgossen und filtriert, sie ist dann bereits für den Konsum geeignet.

Wichtig ist bei dieser Bereitung des Getränkes die Erscheinung, dass die Tibi-Klümpchen während der Gärung an Grösse zunehmen und

unter dem Druck der sich im Innern bildenden Kohlensäuregasblasen an vorher gebildeten Furchen in zwei oder mehrere Stücke zerfallen, die ihrerseits wieder anwachsen und auseinanderfallen. Diese Vermehrung kann sehr intensiv verlaufen und zur Folge haben, dass man nach einer Woche eine zwei-bis dreifache Menge von Klümpchen erhält.

Aus den Veröffentlichungen von BLUMER und PORCHET geht hervor, dass das Tibi-Klümpchen als ein Konsortium zwischen einer Hefe und einem Bakterium anzusehen ist.

Obwohl diese Veröffentlichungen viel Wissenswertes enthalten, sind darin die an dem „Tibi“ verknüpften Probleme keineswegs erschöpft.

An erster Stelle muss hervorgehoben werden, dass durch die genannten Forscher eine Synthese des Konsortiums aus Reinkulturen der zusammengehörigen Organismen nicht erzielt werden konnte. Ganz richtig wurden die symbiontischen Bakterien von PORCHET als Milchsäurebakterien charakterisiert. Jedoch steht wohl noch die Frage offen, in welchem Zusammenhang diese, durch ihre ausgesprochene Kapselform gekennzeichnete, Art zu den bereits bekannten stäbchenförmigen Milchsäurebakterien steht. Hinsichtlich der Art der gelatinösen Substanz des Konsortiums werden in den genannten Veröffentlichungen Vermutungen geäußert. Dazu kommt noch, dass eine kritische Betrachtung der geäußerten Meinungen hinsichtlich der Faktoren, welche die Produktion dieser Substanz im Konsortium bestimmen, uns an der Richtigkeit dieser Meinungen sehr zweifeln lässt.

Es bestand daher gegründeter Anlass die bereits angestellten Untersuchungen nach verschiedenen Seiten hin weiterzuführen.

Schon kurz nach dem Anfang meiner diesbezüglichen Untersuchungen fiel mir auf, dass die Kulturen des symbiontischen Bakteriums in hohem Masse ein Dissoziationsphänomen zeigten. Da ausserdem hervorging, dass sich diese Dissoziation in charakteristischer Weise in derjenigen biochemischen Eigenschaft, welche für das Studium des Konsortiums von ausschlaggebender Bedeutung ist, nämlich das Vermögen der Schleimbildung, äusserte, war eine tiefere Untersuchung dieser Dissoziation unvermeidlich.

Im Laufe der Untersuchung stellte sich allmählich heraus, dass die Variabilität der zu untersuchenden Bakterienart dermassen verschiedene Erscheinungsformen zeigte, dass ein tiefergehendes Studium davon schliesslich zu einer beinahe selbständigen Arbeit heranwuchs. Die dabei hervorgegangenen Resultate wurden in einem gesonderten zweiten Teil dieser Dissertation zusammengefasst.

ERSTER THEIL.  
DAS TIBI-KONSORTIUM.





# KAPITEL I.

## HISTORISCHE ÜBERSICHT.

Nach LUTZ (1899) stammt das Tibi-Konsortium ursprünglich aus Mexiko, wo es auf den scheibenförmigen Stengeln der *Opuntia* vorkommen soll. Weiterhin gibt er eine Beschreibung der Bereitung des Tibi-Getränkes und vom Aussehen der Körner. Mit den bereits in der Einleitung erwähnten Tatsachen stimmen seine Angaben befriedigend überein. Das mikroskopische Bild eines Klümpchens zeigt eine schleimige Masse, in der kurze Bakterien — manchmal auch längere spiralförmige Fäden — und grosse Hefezellen eingebettet sind.

LUTZ kommt in seiner Untersuchung zum Schluss, dass das Tibi-Klümpchen das Resultat einer Symbiose zwischen einer Hefe und einem Bakterium ist und verweist im Zusammenhang damit auf das klassische Beispiel: die Kefir-Körner.

Um die betreffenden Organismen zu isolieren, geht er von der ausgegorenen Flüssigkeit aus und nicht von den Körnern selbst. Dies ist jedoch ein prinzipiell unrichtiges und gefährliches Verfahren.

Auf diese Weise isolierte er:

1. ein eingekapseltes, polymorphes, Gram-negatives, obligat-aerobes und bewegliches Stäbchen, welchem er den Namen *Bacillus mexicanus* gab.

Diese Bakterienart soll unter bestimmten Bedingungen kürzere und längere eingekapselte Formen (1.5—3.3  $\mu$ ) annehmen. In weissen Zusammenklumpungen an der Oberfläche der Kulturflüssigkeit soll der Organismus ebenfalls in der Form von 250—300  $\mu$  langen Fäden auftreten. In Nährlösungen mit Pepton und Zuckerarten war die Entwicklung schlecht; unter dem Einfluss anorganischer Stickstoffverbindungen war sie besser.

2. eine Hefeart: *Saccharomyces Radaisii*, die sich durch ein aerobes Wachstum in zuckerhaltigen Medien unter Hautbildung auszeichnete, während eine Gärung völlig ausblieb. Die Zellen erschienen lose und im Sprossverband. Unter gewissen Bedingungen wurden Ascosporen — 1 bis 4 pro Zelle — gebildet. Zwang LUTZ die Hefe in der Hautform anaerob zu leben, indem er die Haut in kleine Fetzen schüttelte und diese in der Flüssigkeit sinken liess, so wirkte die Entziehung des Sauerstoffes gärungsauslösend.



Diese Erscheinung bringt ihn zu der Überzeugung, dass die Wirkung des Bakterien Schleimes der Klümpchen ausschliesslich als die eines mechanischen Agens zu betrachten ist. Die Umhüllung der Hefezellen zwingt diese zu einer anaeroben Lebensweise. Auf diese Weise soll eine Kombination beider Organismen zu einer Gärung führen.

Wie weiter unten zu sehen ist, erscheint die Schlussfolgerung berechtigt, dass LUTZ in seiner Bemühung zur Isolierung der beiden, den Tibi zusammensetzenden Organismen, fehlschlug und dass er in Wirklichkeit nur begleitende, mehr oder weniger zufällig in der Gärungsflüssigkeit vorhandene Mikroben, vermutlich ein Essigbakterium und eine Kahlhefe erhielt.

Seine Behauptung, es wäre ihm gelungen das Konsortium aus den von ihm isolierten Mikro-Organismen herzustellen, kann nie richtig gewesen sein, wenn man die Beschreibung seiner Organismen in Erwägung zieht (siehe die folgenden Kapitel).

Soweit mir bekannt ist, erschien danach bis zum Jahre 1934 über den „Tibi“ keine Veröffentlichung mehr. Im genannten Jahr aber erschienen ungefähr zur gleichen Zeit, die beiden bereits genannten Veröffentlichungen von BLUMER (1934) und von PORCHET (1934).

BLUMER gibt erst eine sorgfältige Beschreibung der Klümpchen und der Bereitung des Getränkes. Dann stellt er fest, dass bei einer mikroskopischen Untersuchung die Substanz nicht homogen ist. Die Masse erscheint als eine Zusammenballung von teils geraden, teils wurmförmig gekrümmten Schleimkapseln eines Stäbchenbakteriums, welche ausserdem Hefezellen umschliessen.

In Flüssigkeitskulturen erscheinen die Bakterien als Stäbchen, oder infolge unvollkommener Teilung als lange Fäden, ohne Schleimhülle.

Bezüglich der chemischen Art dieses Schleimes, berichtet BLUMER, dass sich nach einer Untersuchung GROGG's herausstellte, dass nach Hydrolyse mit Säure reduzierende Kohlehydrate entstehen, während im Hydrolysat die Resorcin-Reaktion positiv ausfällt. Da die FEHLING'sche Reaktion positiv, die MILLON'sche Reaktion schwach positiv ausfällt, erachtet er es sehr wahrscheinlich, dass die Kapselsubstanz aus Glycoproteiden besteht.

GROGG stellt ausserdem fest, dass die Tibi-Gärung im Rohrzucker-Feigenmedium mit Säurebildung gepaart geht, wobei als Reaktionsprodukte: Milchsäure, Essigsäure, Ameisensäure und Alkohol nachgewiesen werden konnten. Nach einigen Tagen ist der Alkoholgehalt bereits 4 Vol. Proz.; er nimmt weiterhin noch zu und kann manchmal selbst

7 Vol. Proz. betragen. Für eine gute Vermehrung der Körner scheint das Vorhandensein von Feigen notwendig zu sein, während eine synthetische Nährlösung für diesen Zweck ungeeignet ist.

BLUMER schliesst sich teilweise den Erfahrungen und Betrachtungen LUTZ's an. Die von ihm isolierte Hefe ist ebenfalls eine Kahlhefe und BLUMER ist geneigt anzunehmen, dass diese Hefe erst unter dem Einfluss der symbiontischen Bakterien eine Gärung verursacht <sup>1)</sup>.

Was die Bakterien betrifft, weist er darauf hin, dass die Schleimkapseln in den Tibi-Klümpchen sehr stark an die von WARD beschriebenen Scheiden von *Bacterium vermiforme* erinnern, welche von dem genannten Forscher als eines der essentiellen Elemente der „Ginger Beer Plant“ ausführlich beschrieben wurde.

PORCHET (1934) gebührt die Ehre als Erste die essentiellen Organismen isoliert und auf Nährböden als Reinkulturen gezüchtet zu haben; sie ging hierbei aus von Tibi-Körnern, welche unter aseptischen Vorbedingungen in Wasser zerrieben wurden.

Auch nach der Meinung dieser Forscherin sind die essentiellen Organismen ein Bakterium und eine Hefe; sie beschreibt diese folgendermassen:

*Hefe.* elliptisch-langgestreckte Zellen; Abmessungen auf Gelatine (2—4) × (8—12)  $\mu$ . Auf Gips tritt Sporenbildung leicht auf, mit 4—8 Sporen in langgestreckten Zellen. Sie identifiziert diese Hefe als *Saccharomyces pastorianus*.

*Bakterium:* stäbchenförmig, (2—4)  $\mu$ , Gram-positiv, unbeweglich, ohne Sporen, auch in langen Ketten und Fäden vorkommend. Gelatineverflüssigung ist negativ; Impfung in Milch ergibt darin keinerlei Veränderungen, während Stärke nicht angegriffen wird.

Bei der Reinkultur in Hefewasser -3% Glucose tritt sowohl aerob als anaerob eine kräftige Säurebildung auf — Milchsäure und flüchtige Säure — und ausserdem wird Alkohol gebildet. Die schliesslich erreichte Acidität war 43 cm<sup>3</sup> N. pro L. In den Kulturen bildet sich ein flockiges, weisses Sediment, aber keine Haut und kein Ring.

PORCHET bemerkt, dass das Bakterium in dem System von LEHMANN

<sup>1)</sup> In einer brieflichen Mitteilung an Prof. KLUYVER hat BLUMER jedoch bald hierauf diese Ansicht widerrufen. Er erwähnt in seinem Schreiben, dass es ihm bei Fortsetzung seiner Untersuchungen nicht gelang, die anfänglich isolierte Hefeart wieder aufzufinden. Dagegen fand er regelmässig eine *Saccharomyces*- Art, welche keine Kahlhaut bildet und ohne Mitwirkung der Bakterien gärfähig ist. BLUMER betrachtet jetzt diese Art als den eigentlichen Hefekomponent der Tibi-Körner.



und NEUMANN in die Gattung: *Plocamobacterium*, im System von BERGEY in die Gattung *Lactobacillus* einzureihen ist. Im allgemeinen umfassen diese Genera also jene Bakterien, welche in der Literatur vielfach als „lange Milchsäurebakterien“ bekannt sind.

In einer 15% Rohrzuckerlösung findet eine Vermehrung der Klümpchen nicht allein bei Hinzufügen von Feigen, sondern auch von Datteln oder Bananen statt. Ein Weiterzüchten der Klümpchen in nicht sterilem Saccharose-Feigenmedium ohne regelmässige Erneuerung, führt schliesslich zu einer Verunreinigung mit einer begleitenden Mikroflora, wovon Kahlhefen und Essigbakterien die hauptsächlichsten Vertreter sind.

Die Synthese des Tibi-Konsortiums aus den beiden, als essentiell erkannten, Komponenten gelang nicht.

Hinsichtlich der chemischen Zusammensetzung der Grundsubstanz der Tibi-Körner wird die Vermutung ausgesprochen, dass es sich hier um ein Polysaccharid handelt und zwar entweder um ein Achroodextrin oder ein komplexes Kohlehydrat, welches zu der Gruppe der Hemizellulosen gehört.

Bezüglich der Faktoren, welche die Synthese dieser Substanz bedingen, äussert PORCHET die Meinung, dass die Mikroben, namentlich die Hefe, dieses Polysaccharid aus Spuren Stärke bilden. Diese Auffassung erklärt ihr die Tatsache, dass bereits bei Hinzufügen einiger Feigen die Vermehrung der Tibi-Klümpchen sehr gut erfolgt. Das Parenchymgewebe dieser Früchte enthält nämlich eine kleine Menge Stärke.

Diese Vorstellung erscheint a priori sehr unwahrscheinlich, wenn man die grossen Quantitäten der gebildeten Tibi-Masse in Betracht zieht.

Das bisher Besprochene zusammenfassend, können wir folgern, dass uns die Schweizer Mitteilungen das Nachstehende lehren:

1. Die Tibi-Körner sind das Resultat einer Symbiose einer Hefe und eines Bakteriums.
  2. Die essentielle Hefe ist eine gärungserregende *Saccharomyces*-Art.
  3. Das essentielle Bakterium ist ein stäbchenförmiger, polymorpher, Gram-positiver Organismus, der zur Gruppe der sogenannten heterofermentativen Milchsäurebakterien gehört.
  4. In Bezug auf die chemische Natur der festen Substanz des Tibi-Konsortiums wurden auseinandergelungene Vermutungen geäussert: Glucoproteide, Achroodextrin oder Hemizellulose.
-

## KAPITEL II.

### ISOLIERUNG VON IM TIBI-ROHMATERIAL VORHANDENEN MIKROORGANISMEN UND AUFFINDUNG DER DIESES KONSORTIUM ZUSAMMENSETZENDEN SYMBIONTEN.

#### § 1. AUSGANGSMATERIAL UND METHODE.

Als Material habe ich die, bereits in der Einleitung genannten Proben von BLUMER und PORCHET verwendet; sie werden in der Folge mit BM und PM bezeichnet.

Infolge des durch besondere Umstände verzögerten Empfanges befand BM sich in nicht all zu gutem Zustand, roch sauer und erwies sich bei einer näheren Untersuchung stark verunreinigt. Es ist nicht verwunderlich, dass damit eine geringere Vitalität des Produktes zusammenhing.

Die später empfangene PM-Probe hingegen bestand aus frischen, gesunden Klümpchen.

Um nun hieraus die Organismen mittels der Plattenmethode zu isolieren, folgte ich PORCHET's Methode, indem ich die Suspension von vorher gut abgespülten und in sterilem Wasser so viel wie möglich feingeriebenen Klümpchen auf verschiedene feste Nährböden abstrich.

Als solche gebrauchte ich an erster Stelle 10% Saccharose-Hefewasser-Gelatine (in der Folge als Saccharosegelatine bezeichnet). Ich will mich vorläufig nur auf die Beschreibung der Mikroorganismen beschränken, welche ich auf diesem Nährboden zur Entwicklung bringen konnte.

Aus beiden Proben kamen sowohl Hefe- als auch Bakterienkolonien zum Vorschein, welche ich gesondert besprechen werde.

#### § 2. DIE HEFEARTEN.

BM lieferte mir zwei verschiedene Typen von Hefekolonien.

Auf Saccharosegelatine war der eine Typus weisslich-gelb und zeigte die Form eines abgestumpften Kegels, während sich der andere durch ein braun-rosiges, plattes, netzförmig gefaltetes Plakat mit gewelltem Rande auszeichnete.

Für weitere Besonderheiten der ersteren Hefeart verweise ich auf das bei PM Mitgeteilte.

Die letztgenannte platte Kolonieart gehörte einer Kahlhefe an, die sich in Würze aerob in der Form einer matten, netzförmig gefalteten Kahlhaut entwickelte. Auf Gips, Karotten oder Würzeagar fand eine Sporenbildung statt und zwar in der Form von 2—4 halbkugel- oder kugelförmigen Sporen pro Zelle.

Die Zellen waren oval und langgestreckt und konnten entweder einzeln oder paarweise, aber auch in Ketten oder in Sprossverband auftreten.

Die Abmessungen schwankten zwischen  $(1.5-4) \times (6-25) \mu$ .

Auf Grund dieser Resultate schien eine Identifizierung dieser Hefeart gerechtfertigt, stimmte sie doch mit der von LUTZ aus „Tibi“ isolierten Hefe, der er den Namen *Saccharomyces Radaisii* gab, in morphologischer Hinsicht völlig überein<sup>1)</sup>.

Jedoch bestand ein grundlegender Unterschied. Die von mir isolierte Hefeart konnte, auch unter Verwendung der von LUTZ hierzu angegebenen Massregel, nämlich das Zerschütteln der Kahlhaut um dadurch die Hefezellen zu einem anaeroben Leben zu zwingen, keine Vergärung des Zuckers hervorrufen.

Unter Benutzung der Monographie von STELLING-DEKKER (1931) identifizierten wir schliesslich diese Hefe als: *Pichia membranaefaciens* Hansen.

Ausstriche von Suspensionen von PM liessen, hinsichtlich der hefeartigen Organismen, zahlreiche Kolonien eines und desselben Typus auftreten. In jungem Zustand waren diese Kolonien weisslich-gelb, matt und von der Form eines abgestumpften Kegels; sie stimmten völlig mit dem schon erwähnten, aus der BM-Probe erhaltenen Typus überein. Nach 2—3 Wochen zeigten die ältere Kolonien oft am ganzen Aussenrande platte, dick und grobgefaltete Auswüchse, während im Zentrum die ursprüngliche kegelförmige Spitze erhalten blieb.

Auf Gelatineböden ist die halbkugelige oder abgestumpfte Kegelform eine gewöhnliche Erscheinung. Diese Form erwies sich von Gehalt und der thermischen Vorbehandlung der Gelatine, sowie von der Züchtungstemperatur direkt abhängig.

In diesem Zusammenhang verweise ich auf die Normal-, Bolzen- und Zapfenform von Hefekolonien auf Gelatine, wie sie SCHACHNER beschrieb (1929).

Auf Würzeagar waren die Kolonien linsenförmig, glatt-glänzend und kreisrund, aus ovalen und langgestreckten Zellen zusammengesetzt,

<sup>1)</sup> Später hat GUILLIERMOND diesen Namen in *Pichia Radaisii* geändert.



welche im mikroskopischen Präparate einzeln oder paarweise vorkamen.

Die Abmessungen schwankten zwischen  $(3-5.5) \times (8-25) \mu$ . Auch die Kulturen in Würze zeigten sowohl einzelne als auch paarweise Zellen; von einem Sprossverband war wenig oder gar nichts zu bemerken. Auf Gips und Kartoffeln fand Sporenbildung leicht statt. Im allgemeinen waren es 1—4 kugelfunde Sporen pro Ascus, während in langgestreckten Zellen manchmal auch 5—6 Stück beobachtet werden konnten. Nie konnte ich — wie PORCHET angibt — die Anwesenheit von 8 Sporen feststellen.

#### Zuckervergärung.

Dextrose, Laevulose, Mannose . . . . .	+
Saccharose . . . . .	+
Galactose . . . . .	+
Lactose . . . . .	—
Raffinose . . . . .	+ <sup>1/3</sup>

Nach STELLING-DEKKER wurde diese Hefe als *Saccharomyces intermedius* Hansen; synonym. *Saccharomyces pastorianus* II Hansen identifiziert.

Es besteht aller Anlass diese Hefe mit der bereits von PORCHET aus Tibi-Körner isolierten und von ihr *Saccharomyces pastorianus* genannten Art zu identifizieren.

Sowohl das regelmässige Vorkommen dieser Hefe in allen untersuchten Tibi-Proben (vergl. auch die Fussnote auf Seite 19) als auch ihr kräftiges Gärvermögen zwingt uns diese Hefe als den essentiellen Hefesymbiont des Tibi-Konsortiums zu betrachten. Für die nähere Beweisführung verweisen wir auf Kapitel IV.

Wir müssen hingegen die sowohl von BLUMER als auch von mir aus BM isolierte Kahlmhefe als zufällige Verunreinigung auffassen.

### § 3. DIE AUS DEN TIBI-PROBEN ISOLIERTEN BAKTERIENARTEN.

Der bereits früher erwähnte Qualitätsunterschied der beiden Proben kam auch hinsichtlich der aufgefundenen Bakterien stark zum Ausdruck. Die Zahl der untereinander abweichenden Kolonietypen war in beiden Fällen sehr verschieden.

*BM.* Die Saccharosegelatineplatten zeigten nach 5—6 Tagen bei 22° C nebst den Kolonien der bereits erwähnten zwei Hefearten zahlreiche Bakterienkolonien. Teils waren dies kleine, trockene Rosetten (weisslich-gelbe, gelblich und rosafarbige Kolonien mit oder ohne feiner radiärer Streifung), teils waren es dünnschleimige, helle, später sich braun verfärbende Tröpfchen.



Diese verschiedenen Typen wurden Stück für Stück auf Glucose-Hefewasser-Agar-Kreide in Reinkultur gebracht und entpuppten sich als Anhäufungen von Gram-negativen, dicken, kurzen, abgerundeten Stäbchen, welche kräftig Säure produzierten und oft eine Eigenbewegung zeigten.

Die Vermutung, dass wir es hier mit verschiedenen Arten aus der Gattung *Acetobacter* zu tun hatten, wurde durch die nähere Untersuchung bald bestätigt.

Das im Laboratorium für Mikrobiologie gebräuchliche System von FRATEUR, welches eine Einteilung der Gattung *Acetobacter* gemäss der stärkeren oder schwächeren Oxydationsintensität in drei Gruppen bringt: oxydans-mesoxydans-suboxydans, gestattete eine Trennung der isolierten Stämme in drei verschiedene Spezies. Jede dieser Arten vergegenwärtigte dabei eine der oben erwähnten Gruppen. Keiner dieser Typen bildete in Bier ausgesprochene Häute, während in HOYER's mineralem Medium keine Entwicklung auftrat.

Diejenige Art, welche den Nährboden mit Kreide braun färbte, ein Repräsentant der Suboxydansgruppe, konnte als *Acetobacter melanogenum* erkannt werden. Der Repräsentant der Oxydansgruppe war wahrscheinlich *Acetobacter rancens*.

Diese Erfahrungen liessen uns nicht mehr an der Natur des von LUTZ beschriebenen Gram-negativen, beweglichen Organismus zweifeln; es handelte sich gewiss um ein Essigbakterium.

Im Zusammenhang hiermit verweise ich auf die Bemerkung PORCHET's, die ebenfalls auf die Möglichkeit einer Verunreinigung der Tibi-Körner mit *Acetobacter spec.* hinweist.

In dem Chaos der beschriebenen Kolonien auf den Saccharosegelatineplatten fielen einige Kolonien durch ihre besondere Form als emporragende, gelatinöse Klümpchen ganz besonders auf. Bei der nachfolgenden Besprechung der Resultate, die ich mit PM erhielt, werde ich auf diese Kolonien eingehend zurückkommen.

PM. Saccharosegelatineplatten, welche mit einer Suspension der Tibi-Klümpchen bestrichen waren, boten nach 5—6 Tagen bei 22° C ein ganz anderes Bild. Neben dem einen kegelförmigen Hefetypus, waren zahlreiche, kreisrunde, platte bis leichtkonkave mattgläserige Scheiben, deren Dicke zwischen 1—1.5 mm schwankte und deren Durchmesser bis 5 mm betrug, zur Entwicklung gekommen. (Abb. 1 und 2).

Sie bestanden aus einer festen, etwas elastischen gelatinösen Substanz, welche völlig mit der der Tibi-Klümpchen übereinstimmte, nur

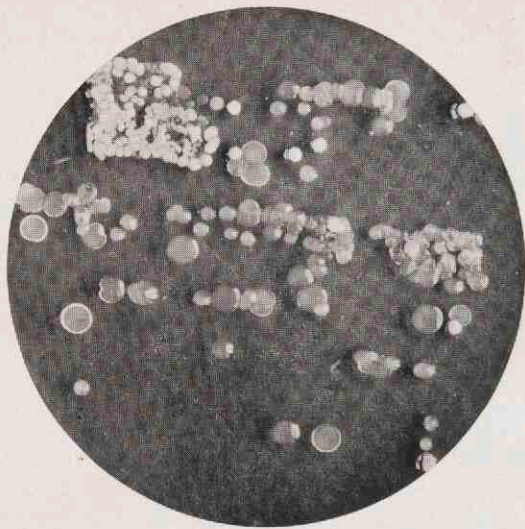


Abb. 1:

Hefewasser - 12% Gelatine - 10% Saccharoseplatte, auf welche die Suspension eines frischen und aktiven Tibi-Klumpchens abgestrichen ist. Es sind die Kolonien von drei verschiedenen Organismen zu beobachten, siehe weiter Abb. 2. Auf  $\pm \frac{3}{4}$  der Originalgrösse.



Abb. 2:

Eine ähnliche Platte wie in Abb. 1;  $\pm$  Originalgrösse. Die drei verschiedenen Kolonietypen sind:

1. Die scheibenförmigen, gelatinösen Kolonien des Tibi-Bakteriums.
2. Die linsenförmigen, weichschleimigen Kolonien von *Betacoccus arabinosaceus*.
3. Die weissen, kegelförmigen Kolonien von *Saccharomyces intermedius*.



Abb. 3:

Hefewasser - 12% Gelatine - 10% Saccharoseplatte mit klumpchenförmigen, gelatinösen Kolonien des Tibi-Bakteriums. Auf halbe Originalgrösse.

beim Zerdrücken zwischen den Fingern etwas weniger fest und solide schien. Die mikroskopische Untersuchung lehrte, dass diese Masse aus einem Konglomerat von voluminösen Kapseln, in welchen stäbchenförmige Bakterien eingebettet waren, bestand.

Neben diesen soeben beschriebenen, von den Kulturplatten leicht abnehmbaren Scheibchen, kam hier und da eine kugel- bis linsenförmige, trübe Tropfenkolonie von einer weichen, butterartigen Beschaffenheit vor. (Abb. 1 und 2).

Dieses halbflüssige, schleimige Material zeigte im mikroskopischen Bild nackte Kokken, die zu Paaren oder in Ketten zusammenlagen. Ab und zu wurden in einem Gesichtsfeld Gruppen ovaler oder auch runder, dickwandiger Kapseln, in welchen sich Diplokokken befanden, vorgefunden. Schon bei schwacher Vergrößerung waren diese Kapselklümpchen aufzufinden.

Aus verschiedenen triftigen Gründen bestand kein Zweifel, dass wir es hier mit dem so bekannten *Leuconostoc mesenterioides* zu tun hatten. Nach der heutigen, von ORLA-JENSEN entworfenen Systematik der Milchsäurebakterien erhält diese Bakterienart den Namen *Betacoccus arabinosaceus*.

Wenn wir die Resultate aus den Plattenkulturen der, die Tibi-Körner zusammensetzenden, Organismen näher betrachten, dann ist man geneigt in Übereinstimmung mit den Mitteilungen von BLUMER und PORCHET zu schliessen, dass die Tibi-Körner zu betrachten sind als das Produkt einer Symbiose zwischen einer Hefe und einem Stäbchenbakterium.

Aus beiden Proben konnte doch eine gärungerzeugende *Saccharomyces* isoliert werden, welche mit der von PORCHET beschriebenen Art befriedigend übereinstimmt.

Es besteht auch wohl kaum ein Zweifel, dass die mikroskopisch in den Tibi-Klümpchen aufgefundenen stäbchenförmigen Bakterien in den oben beschriebenen gelatinösen, scheibenförmigen Kolonien zurückzufinden sind. In dieser Hinsicht kann darauf hingewiesen werden, dass eine mikroskopische Untersuchung lehrte, dass diese Kolonien ebenfalls aus stark eingekapselten stäbchenförmigen Individuen bestehen.

Zu Gunsten der Identität dieser Bakterienart mit dem stäbchenförmigen Tibi-Symbiont spricht weiterhin, dass sie der einzige stäbchenförmige Organismus war, der bei der Analyse von PM auf den Platten zur Entwicklung kam.

Auch beim Abstreichen von BM wurden diese Kolonien erhalten,



obwohl sich daneben überwiegend Kolonien der anderen, schon erwähnten stäbchenförmigen Bakterien entwickelten.

Mit Rücksicht auf das bereits Gesagte besteht aber aller Anlass, diese als Essigbakterien identifizierten Arten als Verunreinigung des Konsortiums zu betrachten. Eine eingehendere Beschreibung der Eigenschaften, sowie eine Identifizierung des bisher vorläufig als Symbiont charakterisierten stäbchenförmigen Bakteriums folgt im nächsten Kapitel.

### KAPITEL III.

#### EIGENSCHAFTEN DES STÄBCHENFÖRMIGEN TIBI- BAKTERIUMS UND SEINE EINREIHUNG IN DAS SYSTEM.

##### § 1. EIN GEMEINSCHAFTLICHES MERKMAL DES TIBI-BAKTERIUMS UND *BETACOCOCCUS ARABINOSACEUS*.

Wie schon erwähnt, lehrten die vorläufigen Untersuchungen, dass beim Ausstreichen feinerriebener Tibi-Klümpchen auf Platten, welche an Stelle von Saccharose, Glucose enthielten, die im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Bakterienkolonien nicht auftraten. Dieser Umstand liess uns vermuten, dass die Schleimbildung des stäbchenförmigen Tibi-Bakteriums ebenso an das Vorhandensein von Saccharose gebunden sein würde, wie dies bereits lange für *Betacoccus arabinosaceus* (*Leuconostoc mesenterioides*) bekannt ist.

Dies veranlasst uns an dieser Stelle einige Bemerkungen über letztgenannte Bakterienart einzufügen.

*Betacoccus arabinosaceus* wurde im Jahre 1878 bereits von VAN TIEGHEM unter dem Namen *Leuconostoc mesenterioides* beschrieben und später unter anderen von BEIJERINCK (1912, A) und von SMIT (1919) ausführlich untersucht.

Durch seine Fähigkeit froschlauchähnliche, schleimige Propfen zu bilden und dadurch die Saftleitungen der Zuckerfabriken zu verstopfen, kam dieser Organismus schon bald in üblen Ruf. Diese Kalamität ist die direkte Folge der hervorragenden Eigenschaft des Bakteriums um aus Saccharose grosse Quantitäten eines schleimigen Wandstoffes — Dextran — zu erzeugen.

Dieses Dextran erwies sich als ein rechtsdrehendes, nur aus Glucosemolekülen aufgebautes Polysaccharid. Es tritt die, hinsichtlich dieser Zusammensetzung merkwürdige Tatsache auf, dass wohl Saccharose, nicht aber Glucose und Fructose und auch nicht ein äquimolekulares Gemisch dieser Zuckerarten, als Ausgangsstoff für die Dextransynthese dienen können. Auch andere Zuckerarten kommen hierfür nicht in Betracht.

BEIJERINCK teilte mit, dass er den Organismus, den er *Lactococcus dextranicus* nannte, beinahe immer mit Erfolg aus Gartenerde, Grabenwasser oder Kanalschlamm anreichern konnte.

Der Organismus, ein heterofermentatives Milchsäurebakterium, in der Form von Diplo- und Streptokokken, kommt in der froschlauchähnlichen Substanz nur in sehr dick eingekapselter Form vor. Züchtet man sie auf Saccharosegelatinenährboden, dann tritt öfters an Stelle dieses festen Wachstums ein solches in weich-schleimigen Dextrankolonien auf. In diesen Kolonien treten die nackten Kokken gegenüber den wenigen kleinen Klümpchen gekapselter Individuen, stark in den Vordergrund.

SMIT wies nach, dass es sich hier um zwei Modifikationen einer und derselben Bakterienart handelt, nämlich die gekapselte *Leuconostoc*-Form und die nackte Form. Beide aber sind instabil und gehen wieder teilweise ineinander über.

Im Anschluss hiermit konnte vor einigen Jahren von LOUWE-KOOYMANS (1930) gezeigt werden, dass unter den dextranbildenden Streptokokken zwei verschiedene Typen zu unterscheiden sind, von welchen der eine ausschliesslich kapsellose Individuen erzeugt, während der andere immer das von SMIT beschriebene Gemisch von gekapselten und ungekapselten Zellen bildet. ORLA-JENSEN (1919) brachte in seinem System der Milchsäurebakterien diese Dextranbildner in der Gattung *Betacoccus* unter. Diese Gattung umfasst alle kokkenförmigen, heterofermentativen Milchsäurebakterien, d.h. diejenigen kokkenförmigen Milchsäurebakterien, welche aus Zuckerarten neben Milchsäure auch Kohlensäure, Essigsäure und Alkohol, weiterhin aus Fructose Mannit erzeugen. Dabei sind sie alle in Milch inaktiv. Die Verteilung in zwei Arten *B. arabinosaceus* und *B. bovis* beruht hauptsächlich auf der Eigenschaft der Arabinosevergärung der erstgenannten Art.

KLUYVER (1931) neigt zur Ansicht, dass alle dextranbildenden Streptokokken zu der Art *Betacoccus arabinosaceus* gerechnet werden müssen.

Da es, wie bereits erwähnt wurde, nicht unwahrscheinlich schien, dass sich das stäbchenförmige Tibi-Bakterium hinsichtlich der Saccharose ebenso spezifisch verhalten würde, wie dies für *Betacoccus arabinosaceus* der Fall ist, wurde allererst der folgende Versuch angestellt.

Es wurde in sterilem Wasser eine der scheibenförmigen Kolonien der Saccharosegelatineplatten sorgfältig suspendiert. Aus dieser Suspension wurden sowohl auf Saccharosegelatine, Glucosegelatine als auch auf Glucoseagarplatten Ausstriche gemacht. Als wir die Platten nach 6 Tagen Bebrütung bei 22° C untersuchten, lieferte die Wuchsform der Bakterien auf den verschiedenen Medien einen vollkommenen Beweis für das oben geäußerte Vermuten.

Auf Saccharosegelatine entstanden wiederum die gleichen scheiben-



förmigen Kolonien, während auf der Glucosegelatine nur kleine, 1—1,5 mm grosse, trockene Kolonien von sehr unregelmässiger Form auftraten. Das mikroskopische Bild, welches uns ausschliesslich nackte Stäbchen zeigte, unterstützt den Schluss, dass auf Glucosegelatine Schleim- und Kapselbildung vollkommen ausbleiben. Auch auf Glucoseagar trat keinerlei Schleimbildung auf. Die Kolonien waren hierauf etwas grösser als auf Gelatine, platt-linsenförmig und schwach fettglänzend. Sie besaßen eine deutlich rauh-körnige Oberfläche und eine unregelmässige Form.

Als *experimentum crucis* wurde von diesem Bakterienmaterial etwas auf eine kleine Probeplatte mit Saccharosegelatine gestrichen. Bereits nach 5 Stunden zeigten sich bei 22° C dünne Streifen einer zusammenhängenden gelatinösen Substanz, welche auf eine rege Schleimbildung aus Saccharose hinwiesen.

In Hinblick auf das Ausbleiben einer Schleimbildung auf Medien, die andere Zuckerarten enthalten, ist der Schluss berechtigt, dass das von mir isolierte stäbchenförmige Tibi-Bakterium mit *Betacoccus arabinosaceus* die auffallende Eigenschaft gemein hat, nur aus Saccharose einen schleimigen Wandstoff zu bilden.

Es wäre hier nun angebracht zwecks Identifizierung des Bakteriums eine sorgfältige Beschreibung seiner morphologischen und physiologischen Eigenschaften zu geben. Jedoch kam ich bald zur Überzeugung, dass das Bakterium ausserdem durch eine regelmässig auftretende Dissoziationserscheinung gekennzeichnet war. Obwohl darüber erst im zweiten Teil dieser Dissertation Näheres mitgeteilt wird, scheint doch hier schon eine kurze Mitteilung vonnöten.

## § 2. DIE BEI DEM TIBI-BAKTERIUM EINTRETENDE DISSOZIATION.

Es wurde die Entwicklung des stäbchenförmigen Tibi-Bakteriums auf Glucoseagar in schleimlosem Zustande zur Erreichung einer Reinkultur benützt. Zu diesem Zwecke wurde in der gebräuchlichen Weise einige Male hintereinander eine verdünnte Suspension der vollkommen freiliegenden Kolonien auf eine nächste Platte abgestrichen. Da das Wachstum bei 22° C zu langsam verläuft, wurden die Platten bei 30° C bebrütet, wodurch ich schon nach 3—4 Tagen über gut entwickelte Kolonien verfügte.

Trotz der Tatsache, dass von einigen aufeinanderfolgenden Platten gut isolierte, rauhe Kolonien suspendiert und abgestrichen wurden, und

eine Reinkultur bereits zu erwarten war, fiel neben dem rauhen Typus regelmässig ein anderer Kolonietypus auf.

Ein Studium dieser Erscheinung in Plattenserien konnte bei aerober Züchtung auf die Dauer nicht stattfinden, da die Entwicklung von Platte zu Platte zusehends abnahm und nach 5 bis 6 Passagen gänzlich ausblieb. Diese Schwierigkeit konnte ich allerdings sofort beseitigen, wenn ich das Bakterium vollkommen anaerob, oder zum mindesten in einer Umgebung mit stark verminderter Sauerstoffspannung, züchtete. Diese Massregel wurde bei der Züchtung bei 30° C auf Glucoseagarboden weiterhin eingehalten.

Jedoch blieb die Erscheinung der Kolonieheterogenität auch beim anaeroben Züchten in zahlreichen aufeinanderfolgenden Platten bestehen. Auch hier war der vorherrschende Kolonietypus „rauh“, matt oder trockenglänzend, unregelmässig am Aussenrande, linsenförmig abgeplattet und 1,5—3 mm im Durchmesser. Der andere, von der rauhen Form sehr gut zu unterscheidende Typus war äusserst dünn und platt, an seiner Oberfläche feingefaltet, bläulich durchscheinend und von unregelmässigen Einschnitten an seinem Rande begrenzt.

Diese oft äusserst dünnen, plakartigen Kolonien konnten eine beträchtliche Grösse erreichen, welche zwischen 3—10 mm schwankte. In ihrer Mitte konnte ein graues, emporragendes, feuchtglänzendes, glattes Zentrum fehlen oder vorhanden sein.

Beim Vorhandensein eines zentralen Knopfes konnte man den Typus wie folgt schildern: es ist eine kleine, glatte, gewölbte Kolonie, welche in eine sehr breite, dünne, feingefaltete Randzone ausläuft. Diese kann in manchen Fällen mehr oder weniger reduziert sein oder gänzlich fehlen.

Die Tatsache, dass diese zweite Form sehr hartnäckig, sei es auch in wechselndem Masse stets wieder auftrat, schloss die Vermutung auf eine Verunreinigung völlig aus. Es zeigte sich die sehr auffallende Erscheinung, dass bei Prüfung jeder Kolonie auf ihr Schleimbildungsvermögen gerade die rauhen Typen auf Saccharosegelatineplatten immer, dagegen die grossen, sehr dünnen und kleinen glatten Typen niemals Streifen einer schleimig gelatinösen Substanz bildeten.

Wie bei so vielen Bakterienarten, haben wir augenscheinlich auch hier einen Fall von „Dissoziation“ vor uns, wobei ein fortwährendes Abspalten einer Kolonievariante in diesem Falle merkwürdigerweise gepaart geht, mit einem vollkommenen Verlust der Eigenschaft: Schleim aus Saccharose zu bilden.

Es zeigte sich diese Dissoziation nicht nur auf Glucoseagar, sondern



auch auf allen anderen Nährböden. Wurden die Bakterien beispielsweise auf Saccharosegelatine ständig weiter gezüchtet, dann erhielt ich immer Platten, welche neben den gelatinösen Scheibchen eine oft sehr wechselnde Zahl kleiner trockener Kolonien aufwiesen. Das Vorhandensein von Saccharose beugt also keineswegs die Veränderungen vor.

Bezüglich der weiteren Beschreibung der Dissoziation und den daran anzuknüpfenden Betrachtungen verweise ich auf den zweiten Teil.

Die vorgenommene Trennung des behandelten Stoffes in zwei Teile bringt mit sich, dass die in dem folgenden Paragraphen gegebene Beschreibung der Morphologie der Zellen des Tibi-Bakteriums unvollkommen bleiben muss.

### § 3. ZELLMORPHOLOGIE DES TIBI-BAKTERIUMS.

Es kommen für eine mikroskopische Untersuchung in Frage: ein frisches Tibi-Klümpchen, eine scheibenförmige gelatinöse Kolonie von Saccharosegelatine, eine trockene „rauhe“ Kolonie auf Glucoseagar.

*Das Tibi-Klümpchen.* Zerdrückt man ein kleines Klümpchen in einer gesättigten Nigrosinlösung unter dem Deckglas, dann erhält man ein sehr interessantes Bild von zahlreichen durcheinander geschlängelten, schlanken, zylindrischen Kapseln, von welchen viele eine beträchtliche Länge besitzen.

In den meisten Fällen kann man in den Enden der Kapseln ein Stäbchen beobachten, welches entweder eingebettet oder aber auch hervorstehend sein kann und deren Länge in den meisten Fällen zwischen (2—4,5)  $\mu$ , bei einer Dicke von (0,8—1)  $\mu$ , schwankt.

*Gelatinöse Scheibekolonie.* Auch hier stossen wir wieder auf Zusammenballungen von meist rund-ovalen Kapseln, wobei wir manchmal auch plumpe, dicke, gestreckte Formen antreffen. Die normalen Abmessungen der Stäbchen (2—6)  $\times$  1  $\mu$  werden ab und zu von fadenförmigen Typen überschritten.

*Trockene, rauhe Kolonie.* Präparate von 3—4 Tagen alten Kolonien bestehen aus nackten, gerade bis leichtgebogenen Stäbchen, hauptsächlich einzeln aber auch in Diplo oder in kurzen Ketten erscheinend. Die für diese rauhe Kolonie typischen Zellen besitzen eine Länge von (2—6)  $\mu$  und eine mittlere Dicke von (0,8—1,3)  $\mu$ .

Jedoch besteht eine deutliche Pleomorphie, da neben längeren Individuen auch schleifenförmige Fäden von 20, 30 bis 40  $\mu$  selten fehlen; andererseits finden wir kleine kokkenartige Elemente und Granula von 0,5  $\mu$  Durchmesser und selbst kleinere, welche sowohl in freiem

Zustand (besonders in alten Kulturen) als auch in den Zellen zu finden sind.

Die im letzten Abschnitte gegebenen Dimensionen stimmen mit denjenigen des von PORCHET isolierten Bakteriums überein. Es besteht also hinreichender Grund das von mir isolierte Bakterium mit jenem von PORCHET als Bakterien-Symbiont der Tibi-Körner beschriebenen Organismus zu identifizieren.

#### § 4. STOFFWECHSEL UND ANDERE EIGENSCHAFTEN DES TIBI-BAKTERIUMS.

In erster Linie muss ich darauf hinweisen, dass alle in diesem Paragraphen besprochenen Eigenschaften nicht allein für die schleimbildenden, sondern auch für alle anderen Varianten des Bakteriums gelten.

Sowohl die Ergebnisse PORCHET's als auch die bereits festgestellte Analogie des Tibi-Bakteriums in biochemischer Hinsicht mit *Betacoccus arabinosaceus*, machte es vom Anfang an wahrscheinlich, dass auch das Tibi-Bakterium zu den eigentlichen Milchsäurebakterien gehört. An erster Stelle wurde festgestellt, dass das Bakterium Gram-positiv war, Wasserstoffperoxyd nicht spaltete, also keine Katalase enthielt und Gelatine auch auf die Dauer nicht verflüssigte. Unter keinerlei Bedingungen konnte eine Sporenbildung nachgewiesen werden.

Hiernach versuchten wir festzustellen, ob das Bakterium wirklich instande war Zuckerarten unter Bildung von Milchsäure zu vergären, wobei allererst die Glucose auf ihre Tauglichkeit als Vergärungs-substrat untersucht wurde. Da in dem bereits geschilderten Gedanken-gang zu erwarten war, dass das Bakterium an die Art der stickstoffhaltigen Komponente des Nährmediums grosse Anforderungen stellen würde, wurde die Glucose vergärung in Hefeautolysat mit 2% Glucose untersucht.

Bei Versuchen einerseits in den gebräuchlichen Gärungsgefässchen nach EINHORN, andererseits in Gärungsfläschchen nach STRUYK, wurde nun sowohl starke Säure- als auch Gasbildung tatsächlich festgestellt.

Das gebildete Gas wurde von Lauge vollkommen absorbiert und bestand also ausschliesslich aus Kohlensäure. In geimpften Kontroll-fläschchen mit Hefeautolysat, aber ohne Zucker, unterblieb die Gasbildung.

Da in der ausgegorenen Flüssigkeit sowohl Milchsäure als auch Essig-säure als Aethylalkohol vorgefunden wurde, ist der Schluss berechtigt, dass das Tibi-Bakterium tatsächlich zur Gruppe der heterofermentativen Milchsäurebakterien gehört.



In Übereinstimmung hiermit stellte sich heraus, dass sich das Bakterium hinsichtlich seiner Stickstoffernährung ebenso verhält wie die anderen Vertreter der genannten Gruppe. Die Entwicklung in glucosehaltigen Medien mit Ammoniumsalzen als einzige Stickstoffquelle war nämlich sehr gering. Dagegen ergaben verschiedene zuckerhaltige Medien, in welchen Eiweissabbauprodukte vorkamen, wie z.B. Hefewasser oder Hefeautolysat mit Glucose, Tomatenextrakt oder Würze, stets eine sehr gute Entwicklung.

Weiterhin war es für eine nähere Charakterisierung der Bakterienart erwünscht ihr Verhalten einer Reihe verschiedener Zuckerarten gegenüber zu untersuchen.

Ich habe dabei die Methodik ELEMA's (1927) gefolgt. Als Stickstoffquelle gebrauchte ich Hefeautolysat. Da diese Stickstoffernährung am besten den Anforderungen entspricht, ist in diesem Medium die Säureproduktion optimal.

Autolysat und Zuckerlösung wurden getrennt sterilisiert; der Zuckergehalt der Nährlösung betrug vor der Impfung 2%.

Nach vierwöchentlicher Bebrütung bei 25° C wurden 5 cm<sup>3</sup> Gärungsflüssigkeit leicht aufgekocht um die gelöste Kohlensäure zu vertreiben, in ein Becherglas gegossen und mit ausgekochtem dest. Wasser auf 50 cm<sup>3</sup> angefüllt. Mit 0,1 N Lauge und Phenolphthalein als Indikator wurde titriert.

Der totale Säuregehalt ist der Mittelwert aus einer Reihe von Bestimmungen und als cm<sup>3</sup> Normalsäure pro 100 cm<sup>3</sup> Nährlösung berechnet.

Ein Vergleich unserer Resultate mit denjenigen eines anderen heterofermentativen, stäbchenförmigen Bakteriums schien uns wichtig, weshalb wir in der nachfolgenden Tabelle I die von ELEMA für seinen Stamm No 8 des *Betabacterium breve* mitgeteilten Zahlen mit aufnahmen.

Im Anschluss an diese Tabelle sei bemerkt, dass die in den Medien mit verschiedenen Zuckerarten — mit einer Ausnahme — auftretende Säurebildung für alle untersuchten Varianten des Tibi-Bakteriums qualitativ völlig und quantitativ praktisch gleich war. Die Ausnahme wurde gebildet bei dem Medium, dem Saccharose als Gärsubstrat hinzugefügt war. Hierin verursachten die schleimbildenden Varianten nur ein Säuregrad von 5,0, während die schleimlosen Varianten dieses Medium viel stärker ansäuerten, bis 9,1.

Nach alledem was im § 1 bereits über die spezifische Schleimbildung aus Saccharose mitgeteilt wurde, kann dieses Ergebnis nicht verwundern.

TABELLE I.

Säurebildung in  $\text{cm}^3$  Normalsäure pro  $100 \text{ cm}^3$  Kulturflüssigkeit mit verschiedenen Zuckerarten (Zuckeralkoholen und Glucosiden).

Substrate:	Tibi-Bakterium	<i>Betabact. breve</i> Stamm 8 Elema
Glucose	9.5	9.9
Maltose	8.6	12.2
Dextrin	—	—
Stärke (lösl.)	—	—
Fructose	8.2	8.4
Inulin	—	—
Saccharose	5.0(9.1) <sup>1)</sup>	9.0
Galactose	9.6	8.4
Lactose	1.5	8.9
Mannose	—	—
Arabinose	21.9	32.0
Mannit	—	—
Glycerin	—	—
Salicin	1.3	—
Xylose	21.5	nicht untersucht.

<sup>1)</sup> Für die Erklärung des zweiten Wertes vergleiche man den Text.

Es kann noch hinzugefügt werden, dass nach Vergärung von Fructose durch das Tibi-Bakterium eine reichliche Bildung von Mannit festgestellt werden konnte.

In Übereinstimmung mit der in der Tabelle I mitgeteilten geringen Säurebildung aus Lactose, erwies sich, dass beim Züchten in Lackmusmilch keine Koagulation der Milch und höchstens nur eine geringe Farbenänderung auftrat.

#### § 5. EINREIHUNG DES TIBI-BAKTERIUMS IN DAS SYSTEM.

Die gesamten in den beiden vorhergehenden Paragraphen mitgeteilten Ergebnisse lassen keinen Zweifel mehr, dass das von mir isolierte Tibi-Bakterium zu den stäbchenförmigen, heterofermentativen Milchsäurebakterien gehört, welche in ORLA-JENSEN'S System der Milchsäurebakterien (1919) in der Gattung *Betabacterium* vereinigt sind.

Es erhebt sich nun die Frage, inwieweit das Tibi-Bakterium, mit einer der von diesem Forscher beschriebenen Arten identifiziert werden kann.

ORLA-JENSEN unterscheidet drei Arten: *Betab. longum*, *Betab. breve* und *Betab. caucasicum*. Die letztgenannte Art kann von vornherein ausser Betracht gelassen werden, da sie — als Symbiont des Kefir-Konsortiums — gerade durch ihre Säurebildung in Milch und durch ihre darin auftretende Bildung von Miniaturkörnchen ausgezeichnet ist.

Bezüglich der beiden anderen Arten berichtet ORLA-JENSEN als wichtigste Unterschiede, dass die Stäbchen von *Betabac. longum* viel grösser sind, während andererseits *Betab. breve* Arabinose und durchwegs auch Xylose sehr kräftig vergärt und *Betab. longum* diese Zuckerarten, in jedem Falle Arabinose, nicht angreift.

Unter diesen Gesichtspunkten betrachtet, können wir also feststellen, dass das symbiontische Bakterium des Tibi-Konsortiums gewiss sehr nahe mit *Betabacterium breve* ORLA-JENSEN verwandt ist.

Ein Hindernis allerdings verbietet uns eine völlige Identifizierung durchzuführen, da ORLA-JENSEN ausdrücklich berichtet, dass keiner seiner Stämme von *Betab. breve* durch eine so äusserst charakteristische Schleimbildung aus Saccharose gekennzeichnet ist.

Trotzdem schien es mir erwünscht, die im Laboratorium für Mikrobiologie vorhandenen Stämme von *Betab. breve* in dieser Hinsicht zu untersuchen.

Von der 6 vorhandenen Stämmen lieferten in der Tat 5 ein vollkommen negatives Resultat. Nur einer der Stämme, welcher vor vielen Jahren von ELEMA aus saurer Kartoffelpülpe einer Groningschen Kartoffelstärkefabrik isoliert wurde, zeigte eine schwache, wenn auch unzweideutige Schleimbildung.

Es scheint mir daher eine Abspaltung des Tibi-Bakteriums von *Betab. breve* nötig und damit die Unterbringung dieses Organismus in eine neue Art der Gattung *Betabacterium*.

Da es sich später zeigte, dass das Bakterium sich doch noch mit einer schon früher beschriebenen Art identifizieren liess, unterlasse ich hier einen Vorschlag für die Speziesbenennung; ich komme hierauf in Kapitel V zurück. Vorher will ich auf das Verhalten des Bakteriums im Tibi-Konsortium eingehen.

---



## KAPITEL IV.

### EINFLUSS DER KULTURBEDINGUNGEN AUF DIE KON- SISTENZ DES BAKTERIENWANDSTOFFES UND DIE SYN- THESE DES TIBI-KONSORTIUMS.

#### § 1. EINLEITUNG.

Dass die in den vorhergehenden Kapiteln als essentielle Elemente des Tibi-Konsortiums beschriebenen Organismen tatsächlich als solche betrachtet werden können, sollte jetzt durch die Synthese des Konsortiums aus diesen Mikrobenarten bewiesen werden.

Im Anfang versuchte ich dies dadurch zu erreichen, dass ich das stäbchenförmige Bakterium und *Saccharomyces intermedius* gleichzeitig oder nacheinander in Nährmedien, wie Hefewasser- und Feigenwasser-15% Saccharose, impfte. Das hierin geimpfte Bakterium machte die Kulturflüssigkeit durch ihre Schleimbildung viskös.

Wurde nun im Stadium der beginnenden Schleimbildung die Kultur mit der Hefe geimpft, dann war das Resultat eine starke und schnelle Steigerung der Viskosität des gärenden Mediums. In dieser dicken, breiartigen Flüssigkeit zeigte sich aber keineswegs eine Bildung von Tibi-Klümpchen. Nur einmal traten in einem Feigen-Saccharosemedium sehr weiche Schleimflocken auf, welche beim Weiterkultivieren an Grösse zunahmten und selbst die ursprüngliche Grösse des Tibi-Produktes annehmen konnten. Die Festigkeit dieser Flocken war aber sehr gering; auch zeigten sie keinerlei Übereinstimmung mit den echten, scharf begrenzten Tibi-Klümpchen, sodass ich von weiteren Versuchen in dieser Richtung absah.

Diese negativen Resultate stehen also mit den gescheiterten Versuchen PORCHET's um die Symbiose wieder herzustellen im Einklang.

Inzwischen erkannte ich, dass eine Reinkultur des Tibi-Bakteriums je nach den Umständen der Kulturbedingungen Wandstoff verschiedener Festigkeit bilden konnte. Daher kam mir der Gedanke für die Synthese das Bakterium in einer derartigen Form zu benützen, in welcher sein Wandstoff fest und gel-artig ist. Anschliessend an diese Überlegungen war es erst geboten systematisch diejenige Faktoren ausfindig zu machen, welche die Festigkeit des Wandstoffes bestimmen.



§ 2. DIE ABHÄNGIGKEIT DER KONSISTENZ DES BAKTERIENWANDSTOFFES VON DEN KULTURBEDINGUNGEN.

a. *Saccharosegelatineplatten.*

Wenn man eine Suspension des Bakteriums auf 10% Saccharosegelatine (12%) abstreicht und die Platte bei 22° C kultiviert, dann kann man Kolonien in Form von platten bis leichtkonkaven Scheibchen feststellen, deren Substanz trübe und gelatinös ist. (Abb. 1 und 2, Seite 24).

Die 1—1.5 mm hohen Kolonien (Diameter 5 mm) und auch die Gelatine um die Kolonien herum sind vollkommen trocken. Nach ungefähr 10 Tagen fällt auf, dass die Oberfläche dieser Scheibchen, die dann oft schüsselförmig geworden sind, feucht ist. Schliesslich sind nach zwei und mehr Wochen, alle Kolonien von einem völlig durchsichtigen, wasserdünnen Flüssigkeitsmantel, der meist nicht drahtziehend ist, umgeben.

Inzwischen hat sich die Kolonie oft schon in kleinere Bruchstücke zerteilt; die Festigkeit der Substanz ist meistens geringer wie vorher. Als Erklärung dieser Erscheinung, deren Auftreten an ein bestimmtes Alter der Kulturplatte (mindestens 10 Tage) gebunden ist, wurde erst an eine Verflüssigung der Gelatine gedacht.

Die Tatsache, dass das Tibi-Bakterium nach monatelangem Züchten auf Glucosegelatine, diese nicht verflüssigt, machte diese Auffassung doch sehr unwahrscheinlich. Ausserdem stellte sich heraus, dass man nach Entfernung der Kolonien und der Flüssigkeit an deren Stellen keine Anweisung für Gelatineverflüssigung hatte.

Allerdings ist oft an der Unterseite der Scheibchen ein kleiner, hervorstehender Knoten in den Nährboden eingesenkt. Jedoch gibt die Grube, die beim Abheben der Kolonie entsteht, keinen Anlass diese Erscheinung einer Verflüssigung zuzuschreiben. Eher konnte man denken an eine Auspressung von Wasser durch den Wandstoff oder durch die Gelatine.

Gegen diese Annahme spricht aber wiederum folgendes Experiment: bringt man etwas völlig getrockneten, pulverisierten Wandstoff<sup>1)</sup> auf Saccharosegelatine, dann quillt dieser Stoff unter Wasseraufnahme aus der Gelatine zu einer glasigen, gel-artigen Masse, welche auch auf die Dauer nicht feucht wird, sodass also vom Auftreten eines Flüssigkeitsmantels durchaus nicht die Rede ist.

Diese Erscheinung ist also offenbar gebunden entweder an die noch

---

<sup>1)</sup> Für die Gewinnung dieses Wandstoffes sei auf Kapitel VIII verwiesen.

wachsende Kolonie oder an die besondere Form, in welcher sich der Wandstoff innerhalb der Kolonie befindet.

Nachdem längere Zeit hindurch auf diesen 10% Saccharose-12% Gelatineplatten immer Kolonien in der Form von Scheibchen auftraten, veränderte sich dieses Koloniebild plötzlich; die Kolonien wuchsen nämlich zu unregelmässigen Klümpchen aus. Viele unter ihnen glichen in ihrer Form den Tibi-Klümpchen. Andere wieder hatten die Form gerader oder abgestumpfter Kegel, während auch regelmässig einige linsen- oder scheibenförmige Kolonien dazwischen waren. Im allgemeinen waren diese Gel-Klümpchen zum grössten Teil in die Gelatine hineingewachsen.

Das plötzliche Auftreten dieser Kolonien mit abweichendem Habitus veranlasste uns die Faktoren, welche diese Erscheinung bedingten, aufzufinden. Da es hinsichtlich der Resultate SCHACHNER's (1929) sehr wahrscheinlich war, dass die Konsistenz der Gelatineböden für diese Erscheinung von grossem Einfluss war, bereitete ich Nährböden mit geringerem Gelatinegehalt.

Tatsächlich wurden nun auf Platten mit einem Gelatinegehalt von 9—10% wieder ausschliesslich scheibenförmige Kolonien erhalten. Später erschienen sie selbst wieder in einigen Plattenserien mit 12% Gelatine. Offenbar sind kleine Unterschiede in der thermischen Vorbehandlung der Gelatine für diese Variationen verantwortlich.

Erniedrigt man weiterhin den Gelatinegehalt der Böden bis 6%, dann entwickeln sich am Rande abgerundete, 2.5 mm dicke Scheibchen, nicht auf, sondern im Substrat, wobei die obere Seite der Kolonie und die Gelatine in einer Fläche liegen.

Bei 3% Gelatine, welche bei 22° C flüssig ist, war das Bild wieder anders. Hier wuchs das Bakterium in der Form von 1.5 cm grossen, linsenförmigen, konvexen Kolonien, welche sich auf dem Boden der Glasdosen befanden und von einer kohärenten, weichschleimigen Beschaffenheit waren.

Die sehr steife 18% Gelatineplatte liess andererseits ausschliesslich unregelmässige, tief und fest in den Böden versunkene Klümpchen entstehen.

In der Festigkeit der Substanz von Scheiben und Klümpchen, welche auf 10%, 12% und 18% Gelatine zur Entwicklung kamen, bestand kein erheblicher Unterschied; das Gel war ziemlich solid, kam aber dem der frischen Tibi-Klümpchen nicht gleich.

Beim Gelatinegehalt von 6% wurde ein geringerer Festigkeitsgrad



des Gels bemerkbar, während bei 3% diese Materie auffallend weicher und breiartig wurde.

Aus der bereits erwähnten Mitteilung SCHACHNER's über die Kolonieförmungen auf Gelatineböden, ist zu entnehmen, dass für die Form der Kolonien die Konsistenz des Gelatine-Gels von ausschlaggebender Bedeutung ist. Diese Konsistenz wird sowohl durch den Gehalt als auch durch die thermische Vorbehandlung der Gelatine und durch die Züchtungstemperatur bestimmt. Da die Züchtungstemperatur in unserem Falle konstant auf 22° C war, konnte sie bei den soeben genannten vergleichenden Versuchen keine Rolle spielen.

Wir sahen oben, dass auch für die Kolonieförmungen des Tibi-Bakteriums diese Faktoren — Gelatinegehalt, und thermische Vorbehandlung — von grossem Einfluss sind.

Die Konsistenz des Gelatine-Gels ist bei 6% noch zu gering um die Kolonien an der Oberfläche zu halten. Dass die Entwicklung nicht in einer Kugel, sondern in einer Scheibe mit abgerundetem Rande erfolgt, wird auf die Festigkeit der gelatinösen Wandsubstanz zurückzuführen sein.

Bei den 10% und 12% Gelatineböden können die Faktoren wie die Oberflächenspannung und Konsistenz der Gelatine und die Konsistenz des Wandstoffes gerade so zusammenwirken, dass die zunehmenden Ausbreitung der Kolonie auf dem Substrat und die weitere Vermehrung der Koloniesubstanz mit einer gleichmässigen Erhöhung durch den „vis a tergo“ zusammengehen.

Das Resultat ist dann ein beinahe rundes Scheibchen. Wenn unter dem Einfluss der Konsistenz und der Oberflächenspannung die horizontale Ausbreitung verzögert wird, findet das Wachstum zugleich in vertikaler Richtung, sowohl nach oben als nach unten statt und eine kegel- oder zapfenförmige Kolonie resultiert. (Abb. 3, Seite 24).

#### b. *Saccharoseagarplatten.*

Impft man mit einer frischen, aktiven Bakterienkultur, dann ist in allen Entwicklungsphasen der Kolonien der Bakterienwandstoff auf Gelatinemedien durch einen Gel-Zustand gekennzeichnet.

Die Agarmedien verhalten sich in dieser Hinsicht anfangs etwas anders. Auf 10% Saccharose-2% Agarböden wird die Anfangsperiode der Kolonieentwicklung durch die Bildung eines durchsichtigen, dünnen, etwas fadenziehenden Schleimes gekennzeichnet. Da sich die Oberfläche des Agarbodens viel leichter befeuchten lässt als die Gelatineoberfläche,

breitet sich darauf die Kolonie besser aus, was wiederum zur Folge hat, dass vor allem auf stark geimpften Stellen meist ein Zusammenfliessen der einzelnen Kolonien eintritt (Bildung grösserer und kleinerer Schleimfelder).

Sowohl in diesen Feldern als auch in den einzelnen Kolonien sehen wir, dass vom Zentrum aus nach der Peripherie hin die flüssige Substanz trübe und visköser wird. Schliesslich endet dies mit dem Übergang der Masse in ein weiches Gel und nur der äusserste Rand der Kolonie bleibt durchsichtig und flüssig. Da im Anfang viel Wasser zur Verfügung steht, liegen wahrscheinlich die noch spärlichen, hydratierten Schleimteilchen zu weit auseinander um zusammenfliessen zu können. Inzwischen nimmt die Zahl dieser Teilchen fortwährend zu und wird schliesslich so gross, dass sie sich zu einem Gel aneinander schliessen.

c. *Flüssiges Medium: Hefewasser-Saccharose.*

Wird eine Reinkultur des Tibi-Bakteriums in flüssigem, saccharosehaltigem Medium gezüchtet, dann hat man es in der Hand, ob auf dem Boden des Kolbens ein Gel auftritt oder nicht.

Lässt man nämlich den Kolben oder die Kulturröhre nach der Impfung ruhig stehen, dann ist die Entwicklung der Bakterien am Boden und in den unteren Flüssigkeitsschichten am stärksten. Es fängt an mit einer kolloidalen Trübung, der eine rasche Zunahme der Viskosität folgt. Diese nimmt dermassen zu, dass das Sediment zu einer ziemlich weichen, mehr oder weniger elastischen, dicken Gel-Platte erstarrt.

Die Konsistenz des Gels auf Agar und in der Kulturflüssigkeit ist durchweg weniger solid, als die der scheiben-oder klümpchenförmigen Kolonien auf 12%-Gelatine. Die Flüssigkeit oberhalb des Gel-Sediments wird nur mässig viskös.

Schüttelt man aber täglich vor und während der Entwicklung die Kulturgefässe gut durch, dann unterbleibt die Gel-Bildung und das Medium wird in seiner Gesamtheit gleichmässig und sehr dick viskös.

Dieser Effekt ist ja sehr begreiflich, denn durch das Schütteln verhindert man, dass sich die Teilchen lokal stark anhäufen und ihr Abstand so gering wird, dass sie zu einem Gel zusammenschliessen können.

§ 3. SYNTHESE DES KONSORTIUMS AUS DEN REINKULTUREN DER ISOLIERTEN HEFE UND DES TIBI-BAKTERIUMS.

Nachdem ich mich über die Möglichkeit die Bakterien mit festem, gel-artigem Wandstoff zu erhalten in den soeben beschriebenen Ver-

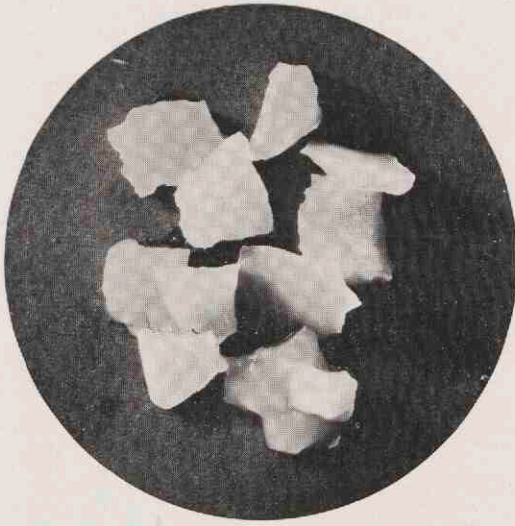


Abb. 4:

Grobe, weich-gelatinöse, hefefreie Stücke eines Gel-Sediments von *Betabacterium vermiforme*, welche für die Synthese des Konsortiums verwendet worden sind (Originalgrösse).

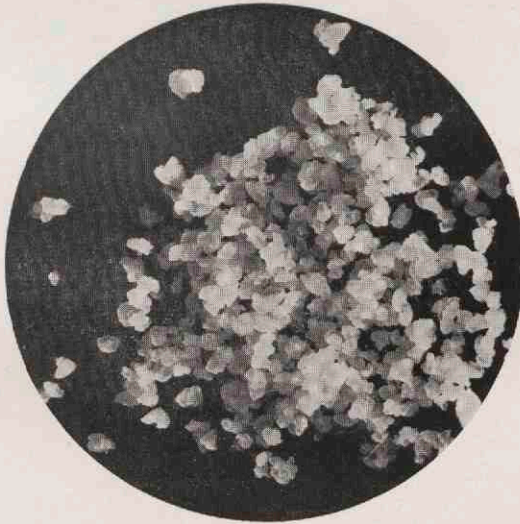


Abb. 5:

Synthetische, aus den Reinkulturen von *Saccharomyces intermedius* und *Betabacterium vermiforme* erhaltene, mit dem Originalprodukt völlig gleichwertige, Tibi-Klumpchen (Auf etwa  $\frac{1}{3}$  der Originalgrösse).





Abb. 6:

Ein Kolben mit 15-prozentiger Saccharoselösung, an welche einige entzwei gerissene, getrocknete Feigen zugefügt sind. Die am Boden des Kolbens befindlichen und zum Teil auch an der Oberfläche treibenden Tibi-Körner erregen eine kräftige Gärung. Gleichzeitig vermehren sich die Körner.



suchen orientiert hatte, entschloss ich mich meine Versuche zur Synthese des Konsortiums wieder aufzunehmen.

Um als Ausgangsmaterial eine Reihe von gelatinösen Kernen zu bekommen, zerteilte ich unter aseptischen Bedingungen eine 0,5 cm dicke, zwar noch relativ weiche, Gel-Platte, die in Saccharose-Hefewasser-Reinkultur gezüchtet war, in kleinere Stücke (Abb. 4).

Diese wurden wieder in frisches Nährmedium gebracht. Die Bakterien wuchsen schnell und nach 24 Stunden hatten die Gel-Klumpen bereits an Grösse zugenommen, während das Medium einigermaßen viskös geworden war.

Ich fügte nun einige cm<sup>3</sup> einer konzentrierten Suspension von *Saccharomyces intermedius* hinzu. Gar bald stellte sich nun beim Heranwachsen der plumpen Stücke heraus, dass in den äusseren Schichten ein Hefe-einschluss stattfand. Man konnte dies durch das Auftreten grauer Adern und Flecken innerhalb der gelatinösen Masse bereits feststellen. Auch diese hefehaltigen Klumpen wurden nun einige Male ohne weitere Hefepimpfung in frisches Nährmedium übertragen.

In verschiedenen dieser unregelmässigen, an grosse Tibi-Körner erinnernden Klumpen, welche an der Oberfläche der Nährflüssigkeit trieben, fand bereits bald eine sehr rege Gärung statt, wobei sich im Innern Kohlensäureblasen bildeten. Nach 10 Tagen setzten wir die Züchtung im Feigen-Saccharosemedium, in welchem sich bei regelmässiger Erneuerung das Konsortium normal zu entwickeln pflegt, fort.

Durch Spaltung, Auseinanderfallen und Wiederanwachsen erhielt ich nach einigen Wochen einen Ertrag an Klümpchen, die in allen Hinsichten: Form, Grösse, Konsistenzfestigkeit und mikroskopischem Bild, dem ursprünglichen, echten Tibi-Produkt entsprachen (Abb. 5). Auch die Gärungs- und Vermehrungskapazität war normal. (Abb. 6). Wir sehen hieraus, dass man nach Hinzufügen von Hefe an ein verhältnismässig weiches Reinkultur-Gel und durch Züchten bei mehrmaliger Wechslung des Mediums, schliesslich ein Gel erhält, das viel steifer und härter ist.

Die Festigkeitszunahme ging mit einem Schärferwerden des mikroskopischen Bildes der Kapseln Hand in Hand. In der Anfangsperiode der Synthese bestand die noch weiche Materie aus meist kurzen, unscharf begrenzten, schlangenförmigen Kapseln, welche beim vollwertigen Produkt schärfer begrenzt, länger und schlanker von Form sind. Dass es gelungen ist, das Konsortium aus Reinkulturen aufzubauen, liefert den

endgültigen Beweis, dass die respektivisch in den Kapiteln II und III als *Saccharomyces intermedius* und als stäbchenförmiges Tibi-Bakterium — *Betabacterium spec.* — beschriebenen Organismen in der Tat die eigentlichen Komponenten des Tibi-Konsortiums sind.

## KAPITEL V.

### MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DES TIBI-KONSORTIUMS UND SEINE IDENTITÄT MIT DER „GINGER BEER PLANT“.

#### § 1. MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DER TIBI-KLÜMPCHEN.

Nachdem die im vorigen Kapitel beschriebene Synthese des Konsortiums gelungen war, ging ich an ein mikroskopisches Studium der Tibi-Klümpchen heran.

Bereits im Kapitel III wurde darüber einiges mitgeteilt; hier folgt nun eine eingehendere Beschreibung. Schon BLUMER berichtet in seiner Veröffentlichung, dass das Konsortium keine homogene mikroskopische Struktur besitzt, sondern aus einer Zusammenballung geradener und gebogener Schleimkapseln besteht. Zerdrückte ich unter einem Deckgläschen ein frisches Tibi-Körnchen in Nigrosinlösung, dann sah ich grössere und kleinere, scharf begrenzte Schollen, welche aus Bakterienwandstoff bestanden und in welchen sich Knäuel von langen, bizarr gewundenen, schlangenförmigen Kapseln mit ovalen und langgestreckten Hefezellen befanden.

Obwohl das Verfolgen der einzelnen Kapseln in diesen Knäueln schwer war, zeigten die Kapseln doch eine sehr scharfe Begrenzung. In vielen Fällen schienen die Wandstoffschollen ganz aus Kapselknäuel aufgebaut zu sein. Bei höherer oder niedriger mikroskopischer Einstellung auf verschiedene Punkte der scheinbar homogenen Substanz, kann man diese Kapseln hervorheben. Es bestehen aber auch Schollen, bei denen auf keinerlei Weise Kapseln aufzufinden sind. Daraus ist zu schliessen, dass ein Teil des Wandstoffes auch in amorphem Zustande vorhanden ist.

Soweit es mir möglich war die Enden der Kapseln zu verfolgen, konnte ich fast immer ein Stäbchen beobachten, welches stets zentrisch oder exzentrisch in den Kapselenden eingebettet war. Die Längenchse dieses Individuums konnte mit der Kapselachse zusammenfallen, aber auch im rechten Winkel zu ihr stehen.

Es kommen aber auch Kapseln vor, deren Stäbchen zur Hälfte oder nahezu ganz aus ihr herausgetreten sind; auch bakterienlose Kapseln können vorkommen.



Die Länge der Stäbchen schwankte zwischen  $2,5-5 \mu$ ; nicht selten war ein granulärer Zerfall festzustellen.

Es ist begreiflich, dass die beschriebenen Präparate sich für eine genaue Erforschung der Form und Dimensionen der schlängelnden Kapseln wenig eignen.

Ein glücklicher Umstand hat mich nun jedoch in die Lage gesetzt über die Gestalt der einzelnen Kapseln genauere Beobachtungen zu machen. Es gelang mir nämlich einen Organismus aufzufinden, der den Bakterien Schleim aufzulösen imstande war. Zur Beschreibung dieses sporenbildenden Bakteriums und der Art und Weise, wie ich es auf das Tibi-Klumpchen einwirken liess, verweise ich auf Kapitel IX.

Durch die lytische Wirkung des Bakteriums, fielen nun die harten Körnchen bald auseinander. Obwohl hierbei der Wandstoff zum grössten Teil abgebaut und aufgelöst wurde, blieb doch stets ein feiner, grauer, flockiger Niederschlag zurück, der nach einer Konzentration durch Abzentrifugieren aus einer grossen Menge von Bakterien, Bakteriosporen, Hefezellen und halbverdauten aber auch intakten Kapseln zu bestehen schien. Die meisten aus dem Knäuelverband herausgelösten Kapseln, zeigten sehr deutlich ihre bizarren Formen (Abb. 7, Seite 45).

Neben Kapseln, die noch so gut wie unberührt waren, kamen oft auch Kapseln vor, die durch das lytische Agens einigermaßen angegriffen waren, was sich zeigte in einem unscharfen Bilde des Kapselumrisses. (Abb. 7, E).

Die Längemasse der Kapseln variierten meistens zwischen 30 und  $100 \mu$ , jedoch können auch noch längere, bis zu  $175 \mu$  vorkommen. Ihre Dicke schwankt meistens zwischen  $2-5,5 \mu$ . Man findet nicht allein rechte oder gekrümmte, einfache, sondern auch zusammengesetzte Formen.

Zu den verschiedenen, in Abb. 7 (A—E) wiedergegebenen und im Konsortium ausgewachsenen Kapseln ist Folgendes zu bemerken. Die schlangenförmigen Kapseln entstehen, wie aus dem folgenden Kapitel hervorgeht, durch ein bleibend einseitiges Wachstum aus ursprünglich ovalen Formen. Durch dieses einseitige Wachstum schiebt sich das Stäbchen am Kapselende fortwährend weiter.

Das Vorhandensein eines Stäbchens an *beiden* Enden einer schlangenförmigen Kapsel ist unzweifelhaft auf eine Zellteilung unmittelbar vor dem Auswachsen der Kapsel zurückzuführen. Dabei werden beide Individuen in entgegengesetzter Richtung am Auswachsen der Kapsel beteiligt sein (Abb. 7, B: die mittelste Kapsel).

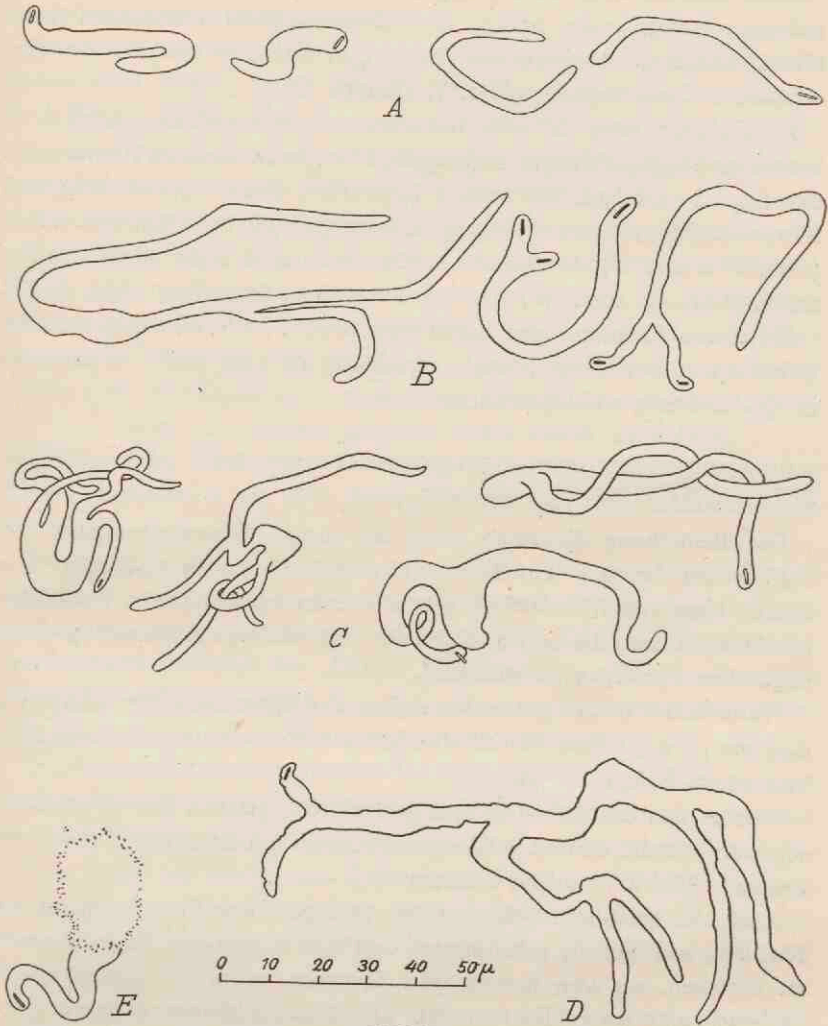


ABB. 7

Verschiedene Formen und Abmessungen freier Bakterienkapseln (von *Betabacterium vermiforme*), welche nach bakterieller Hydrolyse von Tibi-Körnern in der Kulturflüssigkeit vorgefunden sind.

Für weitere Erklärung siehe Text.



Auch können, wenn im Anfangsstadium des Kapselwachstums Zellteilungen stattgefunden haben, die Individuen beim Auswachsen Arme bilden, welche in verschiedenen Richtungen verlaufen und eine gemeinschaftliche Basis besitzen (Abb. 7, Gruppe C).

Anscheinend kann sich ein Stäbchen auch (erst) teilen, nachdem es bereits ein längeres Trajekt zurückgelegt hat; beim weiteren Auswachsen der Kapsel verfolgen die beiden Individuen ihren eigenen Weg und führen somit zu einer Spaltung des ursprünglichen Kapselstammes (Abb. 7, B und D). Ich konnte solche Spaltungen nicht allein von der ersten Ordnung, sondern auch von der zweiten feststellen (Abb. 7, D).

Bei diesen Abänderungen findet man sowohl Fälle, in denen sich das Bakterium in der Längsrichtung verschiebt, als auch solche in denen es in Querrichtung weitergeschoben wird.

#### § 2. IDENTITÄT DES TIBI-KONSORTIUMS MIT DER „GINGER BEER PLANT“.

Die Bemerkung BLUMER's über die grosse Übereinstimmung der Schleimscheiden des Tibi-Konsortiums mit denen der „Ginger Beer Plant“, eines von WARD (1892) beschriebenen symbiotischen Produktes, bracht mich dazu die sehr ausführliche und wichtige Abhandlung dieses englischen Forschers zu studieren.

WARD liefert in der genannten Arbeit den experimentellen Nachweis, dass die „Ginger Beer Plant“ ebenfalls ein Konsortium von einer Hefe und einem Bakterium darstellt.

Was er über das Aussehen und den mikroskopischen Bau dieses Konsortiums mitteilt, stimmt vollkommen überein mit dem Bild, das wir von unserem Tibi-Klumpchen erhalten.

Auch die gelatinöse Substanz der „Ginger Beer Plant“ scheint aus Knäueln, wurstförmig gekrümmten und sich windenden Schleimkapseln zu bestehen, die von kurzen oder längeren eventuell fadenförmigen Stäbchenbakterien gebildet werden. Die Kapseln können an ihrem Ende ein stäbchenförmiges Bakterium enthalten, welches ganz oder teilweise eingebettet ist, jedoch kommen auch bakterienlose Kapselenden vor.

Im Anschluss an die Beschreibungen und Abbildungen WARD's über die Kapseln der „Ginger Beer Plant“, erhob sich bei uns bald die Vermutung, dass der Bakteriensymbiont der „Ginger Beer Plant“ mit jenem des Tibi-Konsortiums identisch sein würde. Mit der, in der letzten Hälfte des vergangenen Jahrhunderts in England sehr bekannten „Ginger Beer Plant“ kann durch Vergärung einer 10—20% Rohrzuckerlösung

mit Hinzufügen eines Stückes Ingwer, ein saures, alkoholhaltiges, musierendes Getränk erzeugt werden.

Aus allem, was wir in WARD'S Abhandlung über die Eigenschaften der Symbionten lernen, geht hervor, dass die von ihm aus der „Ginger Beer Plant“ isolierte Hefe *Saccharomyces piriformis* mit ihrer leicht eintretenden Sporenbildung eine sehr grosse Übereinstimmung mit *Saccharomyces intermedius* aus dem Tibi-Konsortium aufweist.

Aus der weiteren Beschreibung über das essentielle Bakterium der „Ginger Beer Plant“ folgt, dass dieser Organismus pleomorph-stäbchenförmig und ausgesprochen anaerophil ist. In Medien mit Zuckerarten, unter welchen WARD die Saccharose besonders hervorhebt ohne sie jedoch als exklusiv brauchbar zu kennzeichnen, findet die Bildung eines Wandstoffes statt. Aus Zuckerarten wird ausser Milchsäure auch Kohlensäure, flüchtige Säure und Alkohol gebildet (Vergl. LAFAR, 1905-1914).

Nach diesen Mitteilungen unterliegt es keinem Zweifel, dass auch dieser Organismus zu den heterofermentativen Milchsäurebakterien gehört.

Zusammenfassend, kommt man zum Schluss, dass sowohl die „Ginger Beer Plant“ und das Tibi-Konsortium als auch die sie zusammensetzenden Organismen mit einander identisch sind. Da WARD für die stäbchenförmigen Bakterien der „Ginger Beer Plant“ den Namen *Bacterium vermiforme* einführte, wollen wir auch für den Bakteriensymbiont des Tibi-Konsortiums diese Speziesbenennung beibehalten.

Wir haben allerdings in Kapitel III auseinandergesetzt, dass es nach dem heutigen Stand der Systematik der Milchsäurebakterien angebracht ist, diese Organismen in der Gattung *Betabacterium* unterzubringen. Darum wollen wir künftig den Bakteriensymbiont des Tibi-Konsortiums als *Betabacterium vermiforme* nov. comb. bezeichnen; diese Bakterienart ist, wie schon erwähnt, mit dem *Betabacterium breve* Orla-Jensen eng verwandt.

---

## KAPITEL VI.

### DIE KAPSELBILDUNG VON *BETABACTERIUM* *VERMIFORME* IN REINKULTUR.

§ 1. MIKROSKOPISCHE BEOBACHTUNGEN BEZÜGLICH DER ERSCHEINUNGSFORMEN DES BAKTERIUMS IN DER REINKULTUR.

Da die mikroskopische Untersuchung erwiesen hat, dass sich die Bakterien im Konsortium als in schlangenförmig ausgewachsenen und scharf begrenzten Kapseln ganz oder teilweise eingehüllte Stäbchen kennzeichnen, erhebt sich die Frage, ob diese Erscheinungsform für das Symbioseprodukt spezifisch ist oder nicht.

Um dieses festzustellen habe ich die wichtigsten Erscheinungsformen der Bakterien in Gegenwart von Saccharose im Kulturmedium in Reinkulturen mikroskopisch untersucht.

a. *Die Erscheinungsform des Bakteriums im viskösen Teil einer Flüssigkeitskultur.*

Das mikroskopische Bild eines Tropfens visköser Kulturflüssigkeit in Nigrosinlösung zeigt einen unter dem Deckgläschen meistens strömenden Schleim, in welchem sich sehr viele nackte Stäbchen und teilweise lange Fäden befinden. Deutlich sichtbare Kapseln fehlen hierin gänzlich.

b. *Die Erscheinungsform des Bakteriums in einem Gel-Sediment einer Flüssigkeitskultur.*

Zerdrücken wir vorsichtig unter dem Deckglas ein Stück weiches Sediment in Nigrosinlösung, dann zeigen sich im Präparat grössere und kleinere Flocken, ausserdem noch zusammenhängende Felder einer grauen Substanz, die auf den ersten Blick einen ganz homogenen Eindruck macht.

Auf einigen dünneren Stellen glückt es manchmal diese graue Substanz in sehr dicke, grobe und lange Stränge zerfasert zu sehen, deren Verlauf auf kürzeren und längeren Strecken hin zu verfolgen ist.

In der Regel verlieren sich diese Stränge wieder schnell in der Homogenität des Gesichtsfeldes. Aus dieser Beobachtung kann man schliessen, dass das Gel aus einer Anhäufung solcher Stränge besteht. Wahrscheinlich ist es ihrer weichen Konsistenz zuzuschreiben, dass diese Stränge



miteinander zu einer homogenen Substanz verkleben und ihr faseriger Aufbau nur an jenen Stellen sichtbar wird, an welchen ein bestimmter Druck eingewirkt hat.

Bei eingehenderer Betrachtung fällt es auf, dass in dieser homogen erscheinenden Grundsubstanz die Dichte der Masse um den Stäbchen herum oft etwas grösser ist als ihre nächste Umgebung; die Stäbchen bilden dann den Mittelpunkt eines äusserst unscharf begrenzten „helleren“ Fleckes.

Unzweifelhaft handelt es sich hier um noch kleine, ovale und kurz-gedehnte Kapseln (Abb. 8).

Ungefähr das gleiche Bild finden wir im Gel, das von Saccharoseagarmedien herrührt.

c. *Die Erscheinungsform des Bakteriums im scheibchen- und klümpchenförmigen Gel von Kolonien auf Gelatineplatten.*

Beim scheibenförmigen Gel, welches auf einer 6% Gelatine-10% Saccharoseplatte gebildet wird, ist an dünnen Stellen in der grauen Substanz eine verschwommene Abgrenzung ziemlich grosser, oval-runder Kapseln zu unterscheiden, die viele Stäbchen enthalten; sie liegen in grossen Komplexen zusammen (Abb. 10).

An Orten, wo sie in mehreren Schichten aufeinander liegen, macht das Gesichtsfeld einen vollständig homogenen Eindruck und nur an der Anhäufung der Individuen verrät sich das Vorhandensein von Kapseln. Neben Formen, in welchen *viele* Bakterien eingeschlossen sind, zeigen sich kleinere Kapseln mit einer *geringeren* Anzahl (1—5) Individuen.

Hier und da sieht man bei einzelnen Kapseln bereits Typen, welche einen Anfang eines einseitigen Wachstums aufweisen, (kurz-ausgewachsene, plumpe Typen).

Ihre Umrisse sind hier sehr verschwommen. Die scheibenförmigen Kolonien auf 10%- und 12%-Gelatine zeigen grundsätzlich den gleichen Bau, jedoch ist das Kapselbild um vieles schärfer.

Da in den Präparaten aber immer die Materie, auch dort wo sie in dünnen Schichten vorhanden ist, homogen erscheint, müssen wir damit rechnen, dass hier ebenso wie im Konsortium eine homogene, undifferenzierte Substanz vorhanden ist.

In vielen Fällen kennzeichneten sich die *Scheibchen* durch Komplexe ausschliesslich grosser, rund-ovaler und viele Stäbchen führender Kapseln (Abb. 10).

Auch kleinere ovale und einseitig ausgewachsene, kurz-schlangenförmige Typen können vorkommen.



Bei klümpchenförmigen Kolonien von 12%- und 18%-Gelatine kommen ausschliesslich diese letztgenannten Kapseltypen vor. Einige der Entwicklungsstadien, welche nebeneinander angetroffen werden, sind in den Abb. 11 und 12 wiedergegeben.

Bei der Mannigfaltigkeit der Kapselformen (mehr oder weniger runden bis ovalen, kurz-schlangenförmigen- und Übergangstypen) bekommt man den Eindruck, dass die mehr gestreckten, kurz-schlangenförmigen Kapseln durch einseitiges Wachstum der ovalen Formen, innerhalb welcher sich oft nur ein, meist aber nicht mehr als 4—5 Individuen befinden, entstehen.

Aus alledem ersieht man, dass *Betabacterium vermiforme* auch in der Reinkultur seinen Wandstoff in Form von Kapseln abscheidet. Allerdings aber stimmen alle diese verschiedenen Kapselformen nicht mit den langgestreckten und schlanken Typen des Konsortiums überein.

Die im Reinkultur-Gel vorkommenden plumpen, gestreckten Formen mit ihren Stäbchen am Ende können höchstens als Anbahnungen der ausgesprochenen „Schlangenformen“ angemerkt werden.

Mit Hinsicht auf die genannten mikroskopischen Beobachtungen muss man schliessen, dass die ausgesprochen schlangenförmigen Kapseln eine spezifische Erscheinungsform des Bakterienwandstoffes des symbiotischen Produktes sind.

Auch in einem anderen Punkt weicht die Kapselform des in Reinkultur gezüchteten Gels von der des Konsortiums ab; im Reinkultur-Gel sind die Kapseln nämlich viel weniger scharf begrenzt als im Konsortium. Hiermit geht auch eine geringere Festigkeit des Gels im Reinkulturzustand zusammen.

Es war nun angebracht zu untersuchen, ob der Unterschied der Festigkeit, der Schärfe des mikroskopischen Bildes und der Form der Kapseln zwischen in Reinkultur gezüchteten und aus dem Konsortium stammenden Kapseln wirklich ein Symptom ist einer gegenseitigen Beeinflussung beider Symbionten.

Da aus Kapitel IV hervorging, dass während des Züchtens zur Erlangung der Synthese des Konsortiums der Wandstoff langsamerhand die für das Konsortium kennzeichnende Festigkeit erreicht, war es denkbar, dass unter übereinstimmenden Kulturbedingungen, nämlich beim Weiterzüchten unter regelmässiger Erneuerung des Mediums auch das Reinkultur-Gel den gleichen Festigkeitsgrad erhalten würde.

Über die diesbezüglichen Versuche wird im nächsten Paragraphen berichtet.



ABB. 8

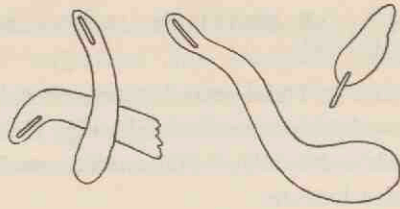


ABB. 10

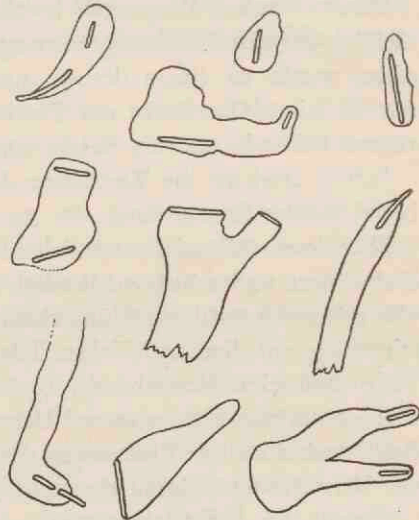


ABB. 9

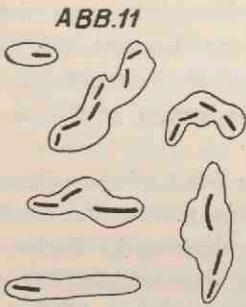


ABB. 11

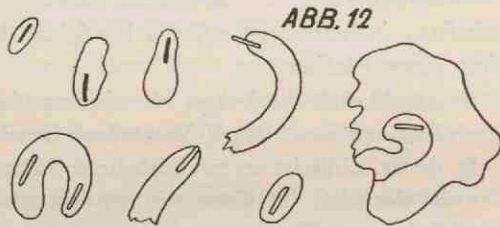


ABB. 12

Kapselformen von *Betabacterium vermiforme* in Reinkultur.

Abb. 8: Sehr unscharf begrenzte Kapseln im weichen Gel-Sediment einer 5—6 Tage alten Flüssigkeitskultur.

Abb. 9: Kapseln in weiter kultiviertem Gel-Sediment (in hefefreien Körnern).

Abb. 10—11—12: Kapseln in gelatinösen Kolonien von Hefewasser-10 % Saccharose-Gelatineplatten. Nur für Abb. 10 ist das Zeichenprisma verwendet. Für weitere Erklärung siehe Text.

## § 2. DIE BEREITUNG HEFEFREIER KÖRNER UND DEREN EIGENSCHAFTEN.

Das in Hefewasser-15% Saccharose weitergezüchtete Reinkultur-Gel, zu welchem eine scheibenförmige Kolonie als Impfmateriel diente, lieferte nach mehrmaligem Nährmediumwechsel eine beträchtliche Menge hefefreier Körner.

Unter diesen Bedingungen beschränkte das Wachstum sich hauptsächlich auf die Volumvergrößerung des ursprünglichen Scheibchens; dieses wuchs zu einem derben, unregelmässigen Klümpchen an und war an seiner Oberfläche mit Furchen und Spalten bedeckt. Beim Berühren fiel es in mehrere Stücke auseinander.

Jedoch erreichte die Konsistenz dieser Klümpchen noch nicht annähernd die des Konsortiums.

Mit diesem Material setzte ich nun einige Male hintereinander die Kultur fort und erhielt schliesslich nach einer Passage von 5 Kolben eine grössere Anzahl von Klümpchen, die in ihrem Aussehen viel Übereinstimmung mit dem natürlichen Tibi-Materiel zeigten. Auch in diesem Falle fand eine Vermehrung, und zwar durch Spalten conchoidaler Flächen entlang, statt, während kleine Gasblasen ebenfalls nicht fehlten. Auch nach 8-maliger Erneuerung des Nährmediums trat keine Abnahme der Vermehrungsfähigkeit dieser hefefreien Körner auf.

Obwohl im Vergleich zum Impfmateriel die Festigkeit tatsächlich grösser wurde, erreichte sie doch keineswegs die des Konsortiums.

Es ist daher der Schluss erlaubt, dass die Hefe auf die Bakterieneigenschaften, insbesondere auf die Festigkeit des Wandstoffes im Konsortium einen Einfluss hat.

Es erhebt sich die Frage, ob wir uns über den Mechanismus dieser Beeinflussung eine nähere Vorstellung machen können.

In erster Linie ist an zwei mögliche Faktoren zu denken: das Vorhandensein der Hefe im Konsortium führt sowohl zu einer stark erhöhten Produktion von Kohlensäure, als auch zu einer beträchtlichen Alkoholzunahme des die Bakterien umringenden Nährmediums. Es war also denkbar, dass entweder eine höhere Kohlensäurekonzentration oder eine höhere Alkoholkonzentration die Festigkeit des Bakterienwandstoffes günstig beeinflussen würde.

Allererst habe ich daher die Körner in normalem Nährmedium, aber in einer Kohlensäureatmosphäre, gezüchtet. Obwohl unter diesen Bedingungen die Körner sich rascher vermehrten und ihre Form unregelmässiger wurde, zeigte sich doch keine merkbare Verbesserung der



Konsistenz. Auch Züchten der Körner in einem Nährmedium, dem 3—4% Alkohol hinzugefügt war, veränderte ihre Festigkeit nicht. Immerhin scheint es nicht ausgeschlossen, dass die im Innern sich befindenden Hefezellen eine örtlich höhere Alkoholkonzentration entwickeln und dass diese durch Wasserentzug die Festigkeit des Wandstoffes der Bakterien beeinflusst.

Die obenmitgeteilten Versuche lehren, dass es nicht gelingt ein Reinkultur-Gel darzustellen, welches genau dieselbe Konsistenz hat wie das Konsortium.

Es schien nun von Bedeutung festzustellen, inwieweit diese Differenz sich auch in der mikroskopischen Struktur der betreffenden Gele abspiegeln würde.

Eine mikroskopische Untersuchung des Gels, sowie es nach dreimaligem Nährmediumwechsel gebildet war, zeigte, dass nun im Gel neben den ovalen Kapseln eine Menge stark in die Länge gewachsene, grobe, schlangenförmige Typen vorkamen, welche ein oder mehrere Stäbchen enthielten.

Als wir diese Kulturen fortsetzten (nach 6 Passagen), konnten wir sowohl Knäuel kurzer als auch langgestreckter, schlangenförmiger Kapseln feststellen, welche aus „hellerem“, nicht scharf aber doch gut sichtbar begrenztem Wandstoff bestanden. Abgesehen von dieser noch unvollkommenen Begrenzung stimmte das mikroskopische Bild jetzt in erfreulicher Weise mit dem des Konsortiums überein.

Die Kapseln hatten alle möglichen Formen; sie waren gerade, gekrümmt, mit kurzen Verzweigungen usw. (Abb. 9, Seite 51).

In dem einen der Kapselenden lagen ganz oder teilweise ein oder mehrere Individuen eingebettet. An jenen Kapseln, deren Anfang und Ende aufzufinden war, zeigte sich der Anfang (Basis) oft als kolbenförmig, oval oder abgerundet.

Auch konnten zwei Kapseln eine gemeinschaftliche Basis haben.

Neben langen Typen, in denen die Längachse des eingebetteten Stäbchens mit der der Kapsel zusammenfällt, findet man auch plumpe, breite Formen mit quer zur Kapselachse eingebetteten Individuen. In den Knäueln finden wir neben Kapseln in verschiedenen Stadien des Auswachsens auch solche, die sich erst zu strecken anfangen. Die „schlangenförmigen“ Kapseltypen mit ihrem einseitigen Wachstum entstehen durch eine fortwährende Synthese von Wandstoff durch das terminal liegende Stäbchen, welches sich dabei in die Richtung seiner Achse oder auch quer zu ihr aufschiebt. Zwischen und um den Kapseln herum



bleibt eine homogene Substanz sichtbar. Es ist nicht ausgeschlossen, dass auch diese anwächst.

Aus dem Obenstehenden ist also der Schluss zu ziehen, dass die mikroskopische Struktur des gel-artigen Wandstoffes im „hefefreien Tibi-Klumpchen“ von dem Bakterienwandstoff des Konsortiums im Grossen und Ganzen nicht wesentlich abweicht. Allerdings sind die typischen „schlangenförmigen“ Kapseln im erstgenannten Falle etwas gröber und weniger lang, während auch ihre Begrenzung weniger scharf ist. Es ist anzunehmen, dass diese Abweichungen verantwortlich sind für den bereits mitgeteilten Unterschied in der Konsistenz des Reinkultur-Gels einerseits und des Gels im Konsortium andererseits.

### § 3. MIKROSKOPISCHE BEOBACHTUNGEN ÜBER DIE ART DER KAPSELENTWICKLUNG.

Im Anschluss an die Beobachtung, dass beim Weiterkultivieren des Reinkultur-Gels in Nährmedien sehr rasch die typisch „schlangenförmige“ Kapselform auftritt und schliesslich zu dominieren scheint, versuchte ich in Tropfenkulturen mikroskopisch das Wachstum dieser Kapseln zu verfolgen.

Mitbestimmend für diese Beobachtungen waren die diesbezüglichen Resultate WARD'S.

Nach zahlreichen Fehlschlägen glückte es diesem Forscher schliesslich, die schlangenförmigen Kapseln der „Ginger Beer Plant“ in Tropfenkulturen wachsen zu sehen. Bei diesem Prozess von Kapselverlängerung zeigte sich, dass sich das terminal liegende Stäbchen recht voraus oder seitwärts verschob und gleichzeitig in seiner Spur neues Kapselmaterial bildete. In diesem Falle konnte das Stäbchen gänzlich oder nur teilweise eingebettet sein.

WARD beobachtete ausserdem Stäbchen, welche aus ihren Kapseln gänzlich heraustraten. Diese Erscheinung sollte nach ihm mit dem Sauerstoff der Luft im Zusammenhang stehen. Beim Übertragen eines eingekapselten Individuums aus einer stark gärenden Nährlösung von PASTEUR<sup>1)</sup> in eine Tropfenkultur desselben Nährmediums, fand WARD, dass sich das Stäbchen sogleich aus seiner Kapsel befreite. Eine Reihe von Beobachtungen lehrte weiter, dass bei der gleichzeitigen

<sup>1)</sup> Die von WARD verwendete Nährlösung von PASTEUR ist ein synthetisches Medium mit: 15 % Saccharose, 1 % Ammoniumtartrat, 0,02 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,002 %  $\text{MgSO}_4$ , 0,002 %  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , welchem etwas Ingwer zugefügt wurde.

Anwesenheit von Hefezellen in der Tropfenkultur bald um das ausgekrochene Stäbchen wieder eine Kapsel entstand.

WARD schreibt dies dem schnellen Verbrauch des Sauerstoffes durch die Hefezellen zu und verweist in diesem Zusammenhang auf eine ähnliche Erscheinung bei der Entwicklung der „Ginger Beer Plant“. Diese Entwicklung bleibt in der Nährlösung von PASTEUR (in Kolben und Flaschen), solange noch freier Sauerstoff im Medium ist, aus. Es tritt nämlich zuerst eine Gärung auf und erst dann setzt die Entwicklung der „Ginger Beer Plant“ ein.

Wie wir später sehen werden, müssen diese Erscheinungen jedoch wahrscheinlich anders interpretiert werden.

Im Laufe meiner Beobachtungen über die Vermehrung der gekapselten Bakterien habe ich der merkwürdigen, von WARD mitgeteilten, Erscheinung des ganz oder teilweisen Austretens der Stäbchen besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Es wurde hierzu im hangenden Tropfen einer Nährflüssigkeit folgender Zusammensetzung: Hefewasser, Hefeautolysat mit 15% Saccharose, 2% Gelatine und verdünnte Nigrosinlösung, kultiviert. Als Ausgangsmaterial wurde eine sehr kleine Menge eines zerdrückten, frischen Tibi-Klumpchens oder des Reinkultur-Gels verwendet. Trotz mehrerer Versuche konnte ich innerhalb der Zeit von 2—4 Tagen nie ein Auswachsen der schlangenförmigen Kapseln beobachten, weder beim Fehlen, noch beim Vorhandensein von Hefezellen.

Dagegen fand eine sehr reiche Wandstoffproduktion statt und zwar unter dem Einfluss freier, nackter, im Präparat befindlicher Stäbchen. Infolge einer schnellen Vermehrung der Individuen füllte sich das Gesichtsfeld zusehends mit einer amorphen Schleimmasse, in welcher keine Kapselformen sichtbar waren.

Da uns also die Tropfenkultur über die Vermehrung der gekapselten Individuen nichts lehrte, begann ich mit mikroskopischen Beobachtungen an Kulturen von Kapselmateriale auf kleinen Saccharosegelatineplatten.

Auch unter diesen Bedingungen zeigte der übergrosse Teil der Kapseln kein Wachstum. Einmal konnte ich jedoch bei einer Kapsel eine geringe Verlängerung ( $2\mu$ ) und ebenfalls eine deutliche Verschiebung des Stäbchens in der Kapsel feststellen.

In der Abb. 13 (A) sieht man das gekrümmte Ende einer schlangenförmigen Kapsel, in welcher man ein kurzes Stäbchen auf einem bestimmten Abstand von der Kontur liegen sieht. Drei Stunden später (B) war das Individuum so weit aufgeschoben, dass es die Kapselkontur erreichte.



Die nächstfolgende Beobachtung zeigte das Austreten unter Richtungsveränderung (C, D). In E liegt das Stäbchen quer und wieder eingebettet. Aus der Zeichnung F ist eine Verlängerung der Kapsel mit bloss  $2 \mu$  ersichtlich. Das Kapselende zeigt eine leichte Anschwellung, zugleich hat sich das Stäbchen geteilt.

Ein anderes Mal beobachtete ich ein deutlich einseitiges Wachstum einer noch ungefähr ovalen Kapsel (Abb. 14, A), deren Verlängerung in einer bestimmten Richtung schon angefangen hatte. Im Anfang setzte sich dieses Wachstum in die gleiche Richtung fort, jedoch veränderte sich diese Richtung nach einem Wachstum von  $2 \mu$  in 7 Stunden radikal. Nachdem noch eine Teilung stattgefunden hatte, änderte sich abermals die Richtung (Abb. 14 C). Ausserdem ist in diesem Stadium zu sehen, dass eines der Individuen aus der Kapsel heraustrat. Danach traten im Präparat Veränderungen auf, die eine weitere Beobachtung ausschlossen.

Trotzdem die Gelatineulturen zur Beobachtung der Vermehrung der *gekapselten* Individuen nicht beitrugen, waren sie doch sehr lehrreich, da sie uns sehr deutlich zeigten auf welche Weise sich die *nackten* Stäbchen inkapselten. Diese Kapseln nahmen rasch an Grösse zu. Mit Ausnahme örtlicher Unregelmässigkeiten, hatten sie eine runde bis ovale Form.

Infolge einer ständigen Vermehrung der Stäbchen nimmt die rundliche Ausdehnung der Kapseln schnell zu (Abb. 15).

Bei diesen Kapseltypen traten vielfach Verschiebungen der Individuen auf; ausserdem konnte hier das völlige oder teilweise Austreten der Stäbchen gut beobachtet werden. Verschiedene Male war ein Verschieben der Stäbchen innerhalb der Kapsel und zwar in der Richtung der Wand zu beobachten. War der Kapselrand erreicht, dann konnte trotzdem noch die Verschiebung in derselben Richtung weiterhin stattfinden; eine kleine Ausstülpung der elastischen Kapselwand war dann die Folge. Einige Zeit hernach wurde diese durchbrochen und das Stäbchen trat mehr oder weniger weit nach aussen. In den meisten Fällen jedoch fand nur ein teilweises Heraustreten statt (Abb. 16, A und B).

Es zeigte sich nun, dass das freie nackte Ende des Stäbchens anfang sich einzukapseln. Dieses Kapselchen sass — gleich einer Mütze — der alten Kapsel auf. Die Substanz dieser neuen Kapsel war weniger dicht und dadurch von der ursprünglichen Kapsel scharf abgegrenzt (Abb. 16, D). Die gemeinschaftliche Grenze beider wurde jedoch allmählich undeutlicher, so dass schliesslich Auswuchs und Kapsel ineinander übergingen.

Merkwürdigerweise behielten diese Auswüchse nicht ihr *einseitiges*

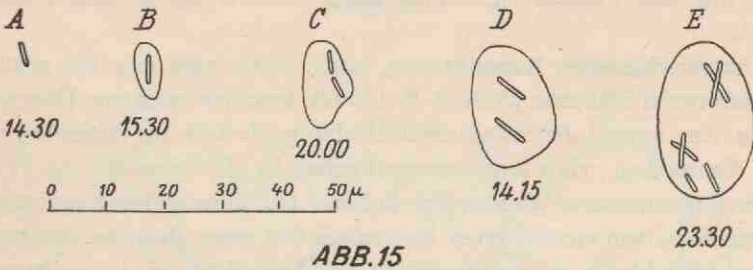
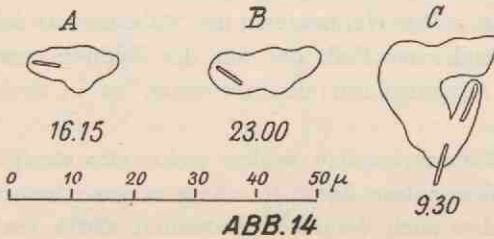
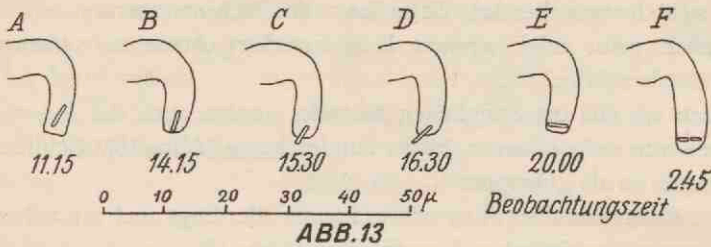


Abb. 13:

Mikroskopische Beobachtung eines aufschiebenden Stäbchens in einer schlangenförmigen Kapsel von *Betabacterium vermiforme* aus dem Tibi-Konsortium.

Abb. 14:

Mikroskopische Beobachtung des Kapselzuwachses. Die Kapsel rührt her von einer gelatinösen Kolonie von *Betabacterium vermiforme*.

Abb. 15:

Mikroskopische Beobachtung aufeinanderfolgender Stadien von Kapselbildung und Kapselzuwachs bei einem nackten Stäbchen von *Betabacterium vermiforme*.



Wachstum bei, sondern es trat entweder gleichzeitig oder gleich hinter dem sich fortschiebenden Stäbchen ein Dickenwachstum ein. Das anfänglich mehr oder weniger langgestrecktes Aussehen verschwand grösstenteils wieder.

Gleich wie die ursprünglichen Kapseln werden auch die Auswüchse meistens von aufgeblasener, ovaler-runder Form (Abb. 18). Schliesslich erscheinen sie als „Quappen“.

Beim Entstehen eines Auswuchses konnte allerdings auch ein teilweises Heraustreten der Stäbchen hinterbleiben (Abb. 17).

Auch habe ich das *völlige* Heraustreten der Stäbchen aus den Kapseln konstatiert. Ein dergleicher Fall, der mit der Bildung einer eigenen Kapsel neben der Ausgangsform zusammenging, ist in der Abb. 16, B—E dargestellt.

Am Ende der Beobachtungszeit wiesen mehr oder weniger bizarre, oft vollkommen bakterienlose Ausläufer riesig ausgewachsener Kapseln auf die Tatsache, dass auch Wandstoffproduktion stattfinden kann, bei der nur das Produkt allmählich nach der Peripherie aufgeschoben wird.

Die verschiedenen Kapselformen, unter ihnen auch jene mit seitlich eingebetteten Stäbchen (Abb. 7, 9, 11, 12), brachten mich zur Überzeugung, dass sowohl die Stäbchenverschiebung, als auch ihr Austreten aus der Kapsel dem „*vis a tergo*“ zuzuschreiben ist, der hinwieder die Folge einer fortwährenden Wandstoffproduktion ist. Sowohl im Konsortium als auch im weiterkultivierten Reinkultur-Gel muss dann die einseitige Wandstoffbildung zu einem einseitigen Anwachsen, d. h. zu langgestreckten, schlangenförmigen Kapseltypen, führen.

Dass die Kapseln auf Gelatine nicht dauernd und ausgesprochen einseitig anwachsen, m. a. W. dass hier die Wandstoffbildung mehr oder weniger in allen Richtungen stattfindet, würde den besonderen dort herrschenden Kulturbedingungen zuzuschreiben sein. Die besondere Art der Nährstoffdiffusion könnte eine Rolle spielen. In dieser Hinsicht wird sich in dem Gel-Klümpchen, mit seinen vielen in weiterwachsenden Kapseln befindlichen Individuen ein komplizierter und nicht analysierbarer Komplex von Faktoren geltend machen.

Aus dem oben Beschriebenen lässt sich ersehen, dass ich die von WARD für *Bacterium vermiforme* beschriebenen Eigenschaften des Kapselwachstums grösstenteils bestätigen kann. Nur glaube ich, dass WARD zu Unrecht den freien Sauerstoff für das Austreten der Stäbchen aus den Kapseln verantwortlich macht. Es ist schon deshalb unwahrscheinlich,

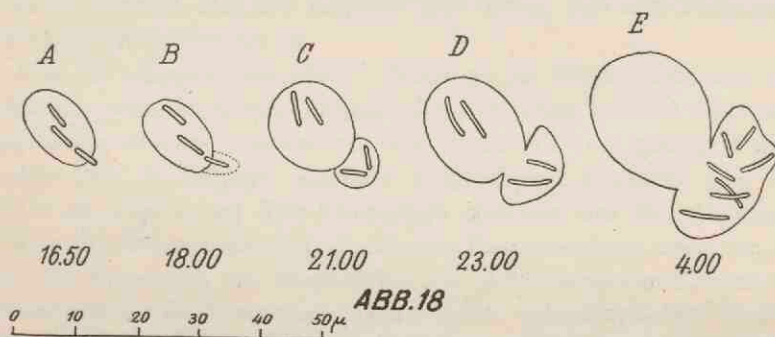
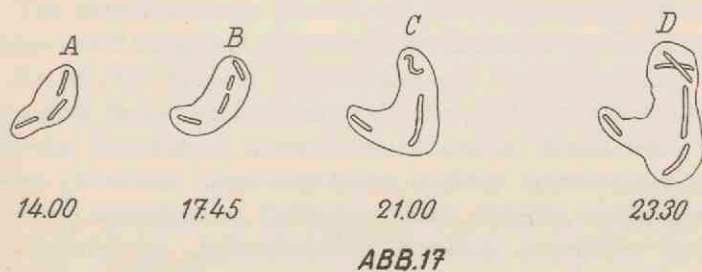
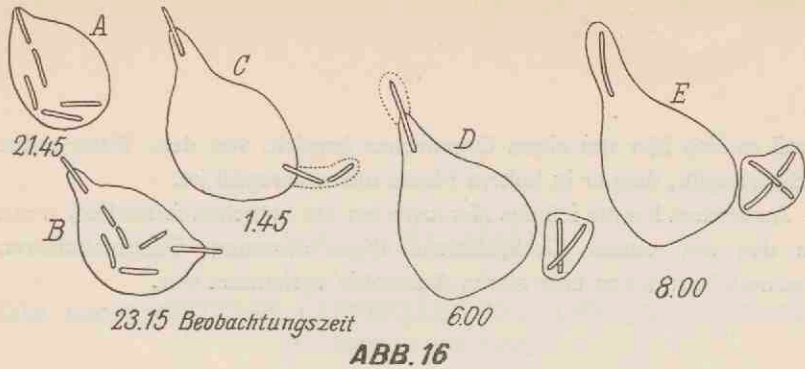


Abb. 16:

wie Abb. 15 — In aufeinanderfolgenden Stadien ist das teilweise und vollständige Heraustrreten von Stäbchen wiedergegeben.

Das hervorstehende, nackte Ende des Stäbchens beginnt sich wieder einzukapseln (C und D). Zu gleicher Zeit zeigen D und E die Bildung einer eigenen, gesonderten Kapsel durch ein vollständig herausgetretenes Stäbchen.

Die sich vermehrenden Stäbchen im Kapselkörper sind in den Stadien C, D und E nicht mehr angegeben. Für weitere Erklärung siehe Text

Abb. 17:

zeigt wie Abb. 15 die Bildung eines Auswuchses bei einer Kapsel ohne Heraustrreten des Stäbchens.

Abb. 18:

Beispiel eines aufgeblasenen, quappenförmigen Kapselauswuchses.

weil es sich hier um einen Organismus handelt, von dem WARD selbst schon angibt, dass er in hohem Masse mikro-aerophil ist.

Ausserdem konnte ich das Heraustreten der Stäbchen feststellen, wenn in den mit einem Deckgläschen abgeschlossenen Gelatinekulturen unzweifelhaft schon eine starke Anaerobie vorhanden war.



## KAPITEL VII.

### DIE GEGENSEITIGE BEEINFLUSSUNG DER SYMBIONTEN IM KONSORTIUM.

#### § 1. EINLEITUNG.

Von allen Forschern, die sich mit dem Studium des Tibi beschäftigt haben, wird angegeben, dass es sich um einen Fall von Symbiose handelt.

Es ist ohne weiteres deutlich, dass das Wort „Symbiose“ in seiner neutralen Bedeutung eines blossen Zusammenlebens zweier Organismen, für die Tibi-Körner anzunehmen ist und in diesem Sinne ist dieses Wort „Symbiose“ denn auch bisher in dieser Arbeit verwendet worden.

Eine beschränktere Definition dieses Begriffs, wobei zur näheren Andeutung von „mutualistischer“ Symbiose gesprochen wird, enthält, dass beide Organismen einander gegenseitig günstig beeinflussen.

Die Frage entsteht nun, ob tatsächlich die Tibi-Symbiose einen solchen Zustand darstellt. Aus der Literatur geht hervor, dass diese Frage nicht näher untersucht worden ist.

Was die „Ginger Beer Plant“ anbelangt, ist WARD (1892) aber der Meinung, dass in diesem Produkt das Bakterium und die Hefe sich gegenseitig derartig beeinflussen, dass beider Aktivität gesteigert wird.

Aus dem in früheren Kapiteln Besprochenen bekommt man den Eindruck, dass es im Tibi-Klümpchen ebenfalls eine Beeinflussungssphäre der Organismen gibt. In diesem Zusammenhang weise ich hin auf die Konsistenz des Wandstoffes, die in den hefefreien Körnern abweicht von der im Konsortium. Auch in der mikroskopischen Struktur des Wandstoff-Gels gibt es unverkennbare, obwohl keine prinzipiellen Unterschiede.

Andererseits müssen wir im Auge behalten, dass neben diesen Symptomen deutlicher Aktivitätserhöhung der Bakterien zwischen diesen und der Hefe eine Konkurrenz besteht hinsichtlich des in der Nährlösung anwesenden Zuckers; beide Organismen sind doch für ihre Vermehrung auf dieses Substrat angewiesen.

Die in den folgenden Paragraphen beschriebenen Beobachtungen haben den Zweck, nähere Angaben über eine eventuelle gegenseitige Beeinflussung zu sammeln.

§ 2. DER GÜNSTIGE EINFLUSS DER HEFE AUF DIE ENTWICKLUNG VON *BETABACTERIUM VERMIFORME* UNTER VERSCHIEDENEN BEDINGUNGEN.

a. *Gleichzeitige Entwicklung der Hefe mit dem Bakterium als geschiedene Reinkulturen in einer und derselben Kulturflüssigkeit.*

In erster Linie habe ich die Entwicklung von jedem der Symbionten separat und von ihrer Mischung in einem Hefewasser-15% Saccharose-medium beobachtet. In diesem Medium zeigen sowohl die Hefe wie auch das Bakterium in Reinkultur eine sehr gute Vermehrung.

Es fiel auf, dass in dem Medium, welches mit dem Gemisch von beiden Organismen geimpft wurde, die Anwesenheit der Hefe eine viel schnellere und gleichmässige Entwicklung des Bakteriums in der ganzen Kulturflüssigkeit zur Folge hatte. Die in der Reinkultur auf dem Boden des Kolbens sonst gebildete Gel-Platte blieb aus, dagegen wurde die Lösung gleichmässig und stark viskös. Dies war offenbar die Folge der kräftigen von der Hefe verursachten Gasentwicklung, wodurch das Medium durchbrodelt wurde.

Eine noch deutlichere Einsicht dürfte von der hierunterfolgenden Versuchsaufstellung erwartet werden, die WARD angewandt hat bei seiner Untersuchung der Beeinflussung der Organismen aus der „Ginger Beer Plant“.

Das Prinzip beruht auf einer örtlich geschiedenen Entwicklung der Hefe und des Bakteriums in einer und derselben Nährflüssigkeit. Zu diesem Zwecke gebrauchte er eine einfache Apparatur, wobei eine Filterkerze in ein, mit einer geeigneten Kulturflüssigkeit gefülltes Zylinder-glas gestellt war. Die Lösung ausserhalb der Kerze wurde nun mit dem Bakterium geimpft, während er innerhalb der Kerze gleichzeitig mit Hefe impfte. WARD teilt nun mit, dass er bei dieser Versuchsaufstellung einen deutlich günstigen Einfluss des Hefewachstums auf die Bakterienentwicklung feststellen konnte; nach einiger Zeit gelangte das Medium ausserhalb der Kerze durch eine intensive Schleimbildung in einen halbfesten Zustand.

Bei meinen Untersuchungen verwendete ich kleine (50 cm<sup>3</sup>) Kolben, welche zu Dreiviertel mit Hefewasser-15% Saccharose gefüllt wurden. In jeden dieser kleinen Kolben wurde eine vorher gut gereinigte Filterkerze gestellt. Nach Sterilisation wurde das Medium ausserhalb der Kerze mit dem Bakterium geimpft. Zur Verhütung der Gel-Bildung wurde das Impfmateriel durch tüchtiges Umschütteln möglichst gleichmässig in der Flüssigkeit verteilt. Bei einem Teil der Kolben wurde



gleichzeitig innerhalb der Kerze mit einer Reinkultur von *Saccharomyces intermedius* geimpft.

Alle Kolben wurden bebrütet bei 30° C. Nach 30 Stunden konnte ein erheblicher Unterschied in der Entwicklung festgestellt werden.

In den Kolben mit Hefe (m. H.) zeigte das Medium eine stark kolloidale Trübung und eine deutlich erhöhte Viskosität. Zehn Stunden später hatte m. H. das *dick-visköse* Stadium erreicht, während das Niveau der Entwicklung in der Kontrolle (o. H.), obwohl noch merklich geringer, in starkem Masse gestiegen war. Nach im ganzen zwei Tagen war der Viskositätsunterschied noch gering und bald war der Rückstand von o. H. nachgeholt.

Die wachstumstimulierende Wirkung der Hefe auf das Bakterium ist in diesem Falle unzweifelhaft der Ausscheidung von Stoffen zuzuschreiben, welche durch die Kerzenwand in das umgebende Medium diffundiert sind.

b. *Vermehrung des Konsortiums und des Bakteriums in Reinkultur in Saccharose-Feigen- und in synthetischem Medium.*

Wenn wir das Verhalten des Konsortiums und des Bakteriums in Reinkultur in verschiedenen Nährlösungen vergleichen, können wir auch auf einen im Konsortium tätigen Einfluss der Hefe auf die Entwicklung der Bakterien schliessen.

Wird eine Reinkultur von *Betabacterium vermiforme* geimpft in Saccharose-Feigenmedium <sup>1)</sup>, dann wächst der Organismus darin ziemlich gut.

Das Medium ändert sich in eine einigermassen visköse Flüssigkeit, wobei der Boden des Kolbens dann und wann die ersten Anzeichen einer Gel-Absetzung aufweist. Der Grad der Entwicklung ist aber bedeutend geringer als in Saccharose-Hefewasser. Bei Kultur des Konsortiums im genannten Feigenmedium hingegen zeigt sich die Entwicklung dieses Produktes als auffallend gut.

In Anbetracht der reichlichen Produktion von neuen Körnern unterliegt es keinem Zweifel, dass das Bakterium sich in dieser Form aktiver zeigt als in Reinkultur.

Noch deutlicher kommt dieser Unterschied zum Ausdruck, wenn man die gleichen Versuche macht in einem Medium, in dem neben Saccharose,

<sup>1)</sup> Dieses Medium wird hergestellt, indem man 8 entzwei gerissene, getrocknete Feigen in 1 Liter Wasser sterilisiert und die Flüssigkeit während einer Woche bei 25° C stehen lässt; danach wird abfiltriert, 15 % Saccharose hinzugefügt und wird die Lösung aufs neue sterilisiert.



ausschliesslich anorganischer Stickstoff in Form eines Ammoniumsalzes anwesend ist. Hierbei möge an die BLUMER'sche Mitteilung erinnert werden, dass es nicht möglich sei, das Konsortium in einem synthetischen Medium mit Zucker zu erhalten.

In einer synthetischen Nährlösung, bestehend aus 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.01%  $\text{MgSO}_4$  und 15% Saccharose ist das Wachstum des Bakteriums in Reinkultur sehr beschränkt. Die Entwicklung ist eigentlich nicht mehr als ein „Angehen“ der Kultur, welches sich äussert in einer geringen, blau-opalisierenden Trübung kolloïdaler Natur; von einer merkbaren Viskositätserhöhung ist nicht oder kaum die Rede.

Im Gegensatz hierzu zeigte eine Reinkultur von *Saccharomyces intermedius* bei nicht zu schwacher Impfung eine befriedigende Entwicklung in diesem Medium. Bringen wir in die Kulturflüssigkeit mit Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle eine Anzahl aktiver, im voraus gut gespülter Tibi-Klümpchen ein, dann zeigt sich nach einigen Tagen bei 25° C eine unverkennbare Vermehrung der Masse. Allmählich sieht man auch die Hefe in der Nährflüssigkeit auswachsen. Auffallend war, dass darnach auch das Bakterium anfang sich in der Lösung zu entwickeln und eine nicht unbeträchtliche kolloïdale Trübung, viel stärker als in der Reinkultur, eintrat.

Nach 5—6 Tagen bestand der Ertrag aus oft noch gerade nicht auseinandergefallenen Klumpen, die mindestens zweimal so gross waren als die des Impfmateriäls. Bei Untersuchung stellte sich heraus, dass diese Körner relativ reich an Hefe waren. Von diesem Material wurde wieder eine Anzahl Stücke in frisches Medium gebracht, wobei das Anwachsen, obwohl meistens etwas geringer als das erste Mal, dennoch sehr deutlich war. Die Hefezellen hatten sich hierbei aber noch sehr stark vermehrt, was den Körnern ein mehr oder weniger kränkliches und graues „beschlagenes“ Aussehen gab.

Als wir die Kultur fortsetzten, stellte sich heraus, dass die Hefeüberwucherung sowohl in- wie auswendig, immer grössere Dimensionen annahm, mit der Folge, dass das Bakterium schliesslich praktisch ganz einging.

Dennoch unterliegt es keinem Zweifel, dass die Anwesenheit der Hefe im Konsortium eine viel stärkere Entwicklung des Bakteriums im fraglichen Medium möglich gemacht hat als diejenige, welche bei Impfung des Bakteriums allein eintritt.

Im Anschluss an diesen Befunden möge noch auf das Folgende hingewiesen werden.

PORCHET teilt in ihrer Veröffentlichung mit, dass sich in einem

Mineralmedium mit Ammoniumstickstoff und 10% Saccharose eine normale Körnerzunahme zeigt, vorausgesetzt, dass diesem Medium noch 0.5% Stärke hinzugefügt wird.

Sie wurde zu diesem Versuch veranlasst auf Grund ihrer Hypothese, dass die günstige Wirkung des Feigenzusatzes (und die anderer Früchte, wie z.B. Bananen) zum Saccharosemedium, der in diesen Früchten anwendenden Stärke zuzuschreiben wäre. Diese Stärke würde dann besonders der Mutterstoff sein für die Bildung der Körnersubstanz. Obwohl diese Hypothese auf Grund von Erwägungen quantitativer Art schon gleich wenig annehmbar ist, habe ich begreiflicherweise im Obenstehenden Anlass gefunden, die Versuche von PORCHET zu wiederholen.

Ich machte also auch Kulturversuche in den ganz laut Rezept von PORCHET bereiteten synthetischen Medien. Hierbei kam ich zu einem Ergebnis, dass vollständig abwich von dem PORCHET's: es stellte sich mir nämlich heraus, dass das wohl oder nicht Anwesendsein von 0.5% Stärke in der saccharosehaltenden Kulturflüssigkeit keinerlei merkbaren Einfluss auf die Entwicklung des Konsortiums hat.

Auf Grund aller meiner Erfahrungen glaube ich denn auch mit Sicherheit sagen zu dürfen, dass die Saccharose das einzige Substrat ist für die Synthese des Wandstoffes, sowohl für die Reinkultur von *Betabacterium vermiforme*, wie für das Konsortium.

Merkwürdig und unbegreiflich ist es denn auch, dass weder PORCHET, noch BLUMER oder LUTZ die Bedeutung der Saccharose als des einzig brauchbaren Substrates für die Synthese des Wandstoffes eingesehen zu haben scheinen.

Dasselbe gilt in gewissem Sinne auch für WARD, was die Wandstoffbildung durch *Bacterium vermiforme*, als Bestandteil der „Ginger Beer Plant“, anbelangt. Dieser Forscher berichtet zwar, dass Saccharose ihm in dieser Hinsicht die günstigsten Resultate lieferte, andererseits aber schliesst er die Brauchbarkeit von Glucose keineswegs vollständig aus.

### § 3. DER EINFLUSS VON KOHLENSÄURE AUF DIE ENTWICKLUNG VON *BETABACTERIUM VERMIFORME* IN REINKULTUR.

Aus den im § 2 beschriebenen Experimenten geht wohl deutlich hervor, dass auf verschiedenen Wegen ein Einfluss der Hefe auf die Entwicklung des Bakteriums nachweisbar ist.

Zunächst werden wir versuchen, uns klar zu werden über das Wesen der Beeinflussung, die bei dem Versuch mit der Filterkerze an den Tag getreten ist.



Hierbei ist zu überlegen, dass die Entwicklung des Bakteriums ja nur im Anfangsstadium stimuliert wird, während am Schluss von einem deutlichen Unterschied in der Entwicklung keine Rede mehr war. Dieses bedeutet, dass die Hefe nur die „lag phase“ des Bakterienwachstums bedeutend verkürzt. Hat das Wachstum einmal eingesetzt, dann zeigt es sich, dass Hefewasser -15% Saccharose auch für das Bakterium allein ein gutes Nährmedium ist, wie z.B. aus der kräftigen Wandstoffproduktion hervorgeht, die sich manifestiert entweder durch das kräftig viskös Werden des Mediums, oder durch die Bildung eines Gels.

Bei dem Filterkerzenversuch liegt denn auch keine Veranlassung vor, an einen Mangel von primär notwendigen Nahrungsstoffen zu denken.

Wie kann man sich nun denken, dass die aus der Hefekultur diffundierenden Stoffe die initiale Entwicklung des Bakteriums so merkbar fördern?

Hier gibt es a priori verschiedene Möglichkeiten. Einerseits scheint es sehr annehmbar, dass die Entstehung von stark reduzierten Systemen in der Hefekultur dazu geführt hat, dass auch der mit dem Bakterium geimpfte Teil der Kulturflüssigkeit beträchtlich reduziert ist und es ist eine bekannte Tatsache, dass dies besonders auch für Milchsäurebakterien eine unentbehrliche Bedingung für kräftiges Wachstum ist.

Andererseits bestand auch Anlass um in dieser Hinsicht an eine zweite Möglichkeit zu denken. Zahlreiche, in den letzten Jahren verrichtete Untersuchungen haben die höchst unerwartete und bemerkenswerte Tatsache ans Licht gebracht, dass sehr auseinandergelungene, heterotrophe Bakterien für ihre Entwicklung die Anwesenheit freier Kohlensäure in ihrem Kulturmedium überhaupt nötig haben (Siehe hierfür z.B. GLADSTONE, FILDES und RICHARDSON, 1935).

Dass bestimmte Milchsäurebakterien in dieser Hinsicht keine Ausnahme bilden, ist neuerdings noch von LONGSWORTH und MAC INNES (1936) bewiesen worden.

Unter diesen Umständen schien es mir wichtig zu untersuchen, ob auch für *Betabacterium vermiforme* von einem solchen Einfluss der Kohlensäure die Rede sein konnte.

In erster Linie habe ich dies untersucht bei dem Kultivieren auf Platten.

Hierzu wurde aus der Suspension einer Bakterienreinkultur auf zwei Saccharosegelatineplatten abgestrichen. Nach Umkehrung der Petrischalen wurde in den Deckel einer Kultur ein mit  $1.5 \text{ cm}^3$  10% Lauge angefeuchtetes Filtrierpapierchen gelegt.



Nach 5—6 Tagen bei 22° C zeigte es sich, dass in dieser Kultur die Entwicklung der gelatinösen Kolonien sehr stark hinter der der Kontrollkultur zurückgeblieben war. Im ersten Falle gab es nur kleine, gelatinöse Tröpfchen in der Grösse von 0.3—0.5 mm. Der Beweis, dass die konstatierte, starke Hemmung von dem Papierchen mit Kalilauge nicht beruht auf der austrocknenden Wirkung, welche von der konzentrierten Lösung auf die Oberfläche der Gelatineplatte ausgeübt wird, wurde folgendermassen geliefert.

Das Papierchen mit Lauge wurde ersetzt durch ein Schälchen mit wasserfreiem Natriumsulfat. Es stellte sich nun heraus, dass die Entwicklung auf diesen Platten, trotz einer bedeutenden Anziehung von Wasser in drei Tagen ihren Rückstand aufholte. Der anfänglich beobachtete „hemmende“ Effekt ist also offenbar eine Folge der Kohlen säurespannungserniedrigung in der Schale.

Das Resultat dieses ersten orientierenden Versuches hat mich dazu geführt, das Verhalten des Bakteriums zu untersuchen in absolut kohlen säurefreier Atmosphäre. Hierzu wurde in einer Wasserstoffatmosphäre bei 30° C gezüchtet auf Saccharose- und Glucoseagar.

Auf Grund früherer Erfahrungen wusste ich schon, dass das mikroaërophile Bakterium unter diesen Bedingungen sehr gut gedeiht. Überzeugender ist dies noch hervorgetreten bei den später zu beschreibenden Versuchen betreffs der Dissoziationerscheinung auf Glucoseplatten. Es stellte sich hierbei heraus, dass nur Kultur in Wasserstoffatmosphäre in langen Reihen von Subkulturen eine konstante Entwicklung verbürgte.

Um nun für den speziellen Versuch, den ich machen wollte, die Atmosphäre vollständig kohlen säurefrei zu bekommen, deponierte ich zusammen mit den Plattenkulturen eine Schale mit 50% Kalilauge in das Gefäss für anaerobe Züchtung; nachdem ein Vakuum gesogen und Wasserstoff durchgeleitet worden waren, wurden ausserdem die letzten Reste von Sauerstoff mit alkalischem Pyrogallol absorbiert.

In einem zweiten Gefäss züchtete ich die Platten in Wasserstoffatmosphäre ohne Lauge, wobei zur Sicherung einer völligen Anaerobie der mit Wasserstoff gefüllte Raum in kurzen Zeitabständen einige Male mit Wasserstoff durchströmt wurde. Bei Wiederholungen des Experimentes machte ich den Inhalt des Gefässes auch wohl auf andere Weise, n.l. mittels einer kleinen Menge Presshefe, sauerstofffrei.

Bei einem Vergleich der Kulturresultate in beiden Gefässen konnte das Folgende beobachtet werden.

In der Atmosphäre ohne Lauge zeigten die Glucoseplatten nach 3—4

Tagen gut entwickelte, schleimlose Kolonien, die Saccharoseplatten öfters zusammengeflossene, schleimige — schliesslich weich-gelatinöse — Kolonien. Die Entwicklung in kohlenstofffreier Umgebung (Gefäss mit Lauge) blieb auf beiden Nährböden gänzlich aus.

Nach einer Woche öffnete ich dieses Gefäss schnell, ersetzte die Lauge und die alkalische Pyrogallolösung durch ein wenig Presshefe und leitete nun, nach Herstellung eines Vakuums, reine Kohlensäure ein.

Der Erfolg war überraschend, denn zwei Tage später fingen die Kolonien an, sich sehr deutlich abzuzeichnen. Dieser Versuch, den ich einige Male mit Erfolg wiederholt habe, beweist also, dass Kohlensäure für die Entwicklung des Bakteriums notwendig ist. Wenn wir weiter berücksichtigen, dass ohne absichtliche Hinzufügung von Kohlensäure — d. h. in der Wasserstoffatmosphäre bei Abwesenheit von Presshefe — auch noch eine Entwicklung eintritt, dann müssen wir wahrscheinlich daraus schliessen, dass das Wachstum schon ermöglicht wird, wenn die von dem Bakterium in seinem Stoffwechsel gebildete Kohlensäure nicht weggenommen wird.

Beim Vergleich von Kulturen in Wasserstoffatmosphäre mit denjenigen, welche in reiner Kohlensäure entstanden waren, hat sich herausgestellt, dass bei letzteren die Entwicklung im allgemeinen schneller vor sich ging.

Auch in der Abhandlung WARD's wird schon über die Wirkung der Kohlensäure gesprochen. Es kann kaum Wunder nehmen, dass WARD seinerzeit noch nicht den Schluss gezogen hat, Kohlensäure sei für die Entwicklung eines heterotrophen Bakteriums wie *Bacterium vermiforme* unentbehrlich. Wohl schliesst er aber aus seinen Beobachtungen, dass das Bakterium seine gelatinöse Kapseln (Gel) nur bildet, wenn das Medium Kohlensäure enthält. Der von ihm beschriebene, umständliche, viele Wochen dauernde Versuch rechtfertigt diese Schlussfolgerung aber nicht. Bei diesen Versuchen verwendete er eine Flüssigkeitskultur des Bakteriums. Während der ersten Periode wurde mit sehr unregelmässigen Zeitabschnitten die gebildete Kohlensäure weggepumpt und es zeigte sich WARD nun, dass erst nach dem Zuschmelzen der Kulturröhre (2te Periode) sich ein Gel absetzte.

Wenn man bedenkt, dass das Medium keinen Augenblick ohne Kohlensäure gewesen ist und dass im Gegenteil während der grossen Intervalle zwischen den Momenten des Vakuumpumpens die Mengen der Kohlensäure nicht unbedeutend gewesen sind, dann scheint es wohl übereilt, hieraus auf die essentielle Bedeutung der Kohlensäure für die Gel-Bildung zu schliessen.



In Anbetracht der grossen Bedeutung, die WARD diesem Ergebnis beilegt, hielt ich es für angebracht, seine Kulturversuche zu wiederholen.

Um die Kohlensäure so effektiv wie möglich zu entfernen, habe ich aber Lauge verwendet. Kulturröhren mit 5 cc. Hefewasser-15% Saccharose wurden, nach Impfung aus einer jungen Glucose-Flüssigkeitskultur und nachdem ein Teil versehen war mit einem zweiten Wattentropfen mit einigen Tropfen 50% Kalilauge und ein Teil mit einem Wattentropfen ohne Lauge, in der Flamme ausgezogen. Die genannten Röhren wurden evakuiert, wobei das Medium unter dem Einfluss einer sehr geringen Erwärmung die Gelegenheit bekam, tüchtig auszukochen.

Die Röhren, welche mit laugehaltiger Watte versehen worden waren, schmolz ich danach direkt zu, während die anderen erst eine Füllung erhielten mit reiner Kohlensäure bei 1 Atmosphäre.

Bei 30° C war nach einiger Zeit bei allen Kulturen eine gute Entwicklung eingetreten in Form einer viskösen Trübung und eines Gels unten in der Röhre. Die ziemlich stark wechselnde Dicke des Gel-Kissens stand im umgekehrten Verhältnis zu dem Grad der Viskosität der Flüssigkeit.

Als der Versuch unter den gleichen Bedingungen wiederholt und die Kultur ausserdem einige Male tüchtig geschüttelt wurde, blieb jedoch eine deutliche Gel-Bildung überall aus.

Aus Obenstehendem kann folgendes geschlossen werden:

1. In anaerober Flüssigkeitskultur ist es nicht möglich, lediglich dadurch, dass man etwas Lauge in die über der Flüssigkeit stehenden Gasatmosphäre anbringt, die Entwicklung des Bakteriums ganz zu unterdrücken. Wir müssen offenbar annehmen, dass unter diesen Bedingungen die *Produktion* von Kohlensäure im Medium infolge der Gärungskapazität der in die Lösung eingebrachten Keime schneller stattgefunden hat als die *Entfernung* derselben unter dem Einfluss der Lauge.

2. Die Bildung eines Gels kann sehr wohl auftreten in einer Kultur unter Bedingungen, die im Prinzip denen entsprechen, welche in der ersten Periode von WARD's Versuch galten.

Neben der Tatsache, dass Kohlensäure wachstumsauslösend und stimulierend wirkt, ist noch zu erwähnen, dass die Züchtung in einer reinen Kohlensäureatmosphäre einen sehr deutlichen Effekt hat auf das Aussehen der sich bildenden gel-artigen Substanz.

Es ist mir u.a. aufgefallen dass, auf Saccharosegelatineplatten, welche



unter normalen aeroben Kulturbedingungen nur „scheibenförmige“ Kolonien zur Entwicklung brachten, in reiner Kohlensäureatmosphäre der Habitus dieser Kolonien sich geändert hatte. Das Plattenbild war gekennzeichnet durch unregelmässige Klümpchen auf der ganzen Linie; dieser Kolonietypus kann sich übrigens auch unter normalen Kulturverhältnissen auf Gelatine zeigen.

Dass der obengenannte Effekt tatsächlich der Kohlensäure zugeschrieben werden konnte, ging hervor aus Kontrollplatten, worauf in Wasserstoffatmosphäre der ursprüngliche Typus erhalten blieb. Auch bei anwachsenden Gel-Bröckchen in Flüssigkeitskultur ist die Tendenz der Kohlensäure, um dem Produkt ein ausgesprochen unregelmässiges, Tibi-Körner-artiges Aussehen zu geben, ans Licht getreten.

Züchtet man ein Stückchen Gel, z.B. einer scheibenförmigen Kolonie, in kleinen Kolben mit flüssigem Medium (Hefewasser-15% Saccharose) einerseits anaerob in reiner Kohlensäure, andererseits anaerob in Wasserstoff unter möglichst vollständiger Absorption der Kohlensäure durch Lauge, dann konstatiert man nach einer Woche (bei 30° C), dass in beiden Fällen die Kulturflüssigkeit viskös geworden ist und sich auch ein mehr oder weniger entwickeltes Gel-Sediment gebildet hat. Das ursprüngliche Impfmateriale ist dann auch angewachsen zu einem tüchtigen Klumpen. In der Kohlensäureatmosphäre ist die Form des Klumpens sehr unregelmässig, gekraust, mit Einschnitten und Furchen versehen, wodurch das Ganze nur locker zusammenhängt.

Dagegen hat das im Milieu mit Wasserstoff und mit Lauge ausgewachsene Klümpchen ein glatteres und weniger unregelmässigeres Aussehen.

Bei wiederholter Überimpfung in frischem Medium behauptete sich dieser Unterschied.

Bei Züchtung unter normalen, aeroben Verhältnissen bekommt das Klümpchen gleichfalls ein mehr oder weniger gekraustes, eingeschnittenes Aussehen.

#### § 4. DIE BEDEUTUNG DER HEFE FÜR DIE STICKSTOFFERNÄHRUNG DES *BETABACTERIUM VERMIFORME*.

Jetzt bleibt uns noch die nähere Betrachtung des im § 2 dieses Kapitels beschriebenen Versuchs, der lehrte, dass in der gebrauchten synthetischen Nährlösung das Bakterium in Reinkultur schlecht und bei Anwesenheit von Hefe erheblich besser wächst.

Dieser günstige Einfluss der Hefe kommt auch zum Ausdruck in einer nicht unbedeutenden Vermehrung des Konsortiums in diesem Medium.

Der Umstand, dass die stimulierende Wirkung der Hefe deutlicher in Erscheinung tritt, je nachdem das Medium ärmer ist in seiner Stickstoffernährung, bringt uns von selbst zu einer Betrachtung der „Stickstoffernährung“ bei Milchsäurebakterien.

Hierüber möge kurz das Folgende mitgeteilt werden.

Bis vor einigen Jahren hatte man immer gedacht, dass Milchsäurebakterien für ihren Stickstoffbedarf jederzeit auf ein mehr oder weniger vollständiges Gemisch von Eiweissbausteinen angewiesen waren. ORLA-JENSEN hat dann bewiesen, dass diese Bakterien sich auch in einer synthetischen Nährlösung mit Ammoniumsalzen als Stickstoffquelle durchaus entwickeln können.

Besonders ist dies der Fall, wenn neben den Ammoniumsalzen auch einige Aminosäuren in kleinen Mengen im Medium anwesend sind. Auch dann aber zeigt sich die Entwicklung nur möglich, wenn gleichzeitig Bio-Aktivatoren anwesend sind.

Als solche nennt ORLA-JENSEN (1936) in erster Linie Flavin und „Bios“<sup>1)</sup>.

Diese Aktivatoren, wovon der letztere aus verschiedenen Komponenten besteht, kommen denn auch vor in allen, für Milchsäurebakterien als ausnehmend geeignet betrachteten stickstoffhaltigen Nährmedien, wie Hefeautolysat, Hefewasser, Tomatenextrakt, Würze und Milch.

Mit Biospräparaten, die aus Hefeautolysat und Molken bereitet worden sind, wird die Entwicklung der kokken- und stäbchenförmigen Milchsäurebakterien stimuliert, nicht nur in synthetischen Medien, sondern auch in Milch, welche durch eine Noritbehandlung inaktiviert worden ist. Wir sahen bereits, dass auch *Betabacterium vermiforme* für seine Entwicklung einen ausgesprochenen Bedarf an organischer Stickstoffverbindungen hat, denn in einem rein synthetischen Medium mit Ammoniumsalzen als einzige Stickstoffquelle ist die Entwicklung sehr schlecht. Hefeautolysat, Hefewasser und Tomatenextrakt eignen sich dagegen ausgezeichnet um den Stickstoffbedarf des Bakteriums zu decken.

Nun hat NIELSEN (1937) noch neuerdings in überzeugender Weise gezeigt, dass Hefe während ihres Wachstums in synthetischer Nährlösung mit Ammoniumsalzen, organische Stickstoffverbindungen ins Medium ausscheidet, und zwar zeigte es sich, dass diese Ausscheidung stärker war, je nachdem die Hefe sich kräftiger entwickelte. Nach Beendi-

<sup>1)</sup> ORLA-JENSEN versteht hier unter „Bios“ offenbar den Hauptbestandteil des Bios-Gemisches, nach ihm sollte dies wahrscheinlich Pantothenäure sein.



gung des Wachstums trat schliesslich Autolyse ein, die aus der Natur der Sache gleichfalls mit Ausscheidung organischer Stickstoffverbindungen verbunden war.

Auf Grund dessen war zu erwarten, dass, wenn man in einer synthetischen Nährlösung im voraus eine Reinkultur von *Saccharomyces intermedius* zur Entwicklung kommen lässt, dieses Medium für das Wachstum von *Betabacterium vermiforme* beträchtlich günstiger geworden sein wird. Der folgende Versuch zeigt, dass dies denn auch wirklich der Fall ist.

In 100 cm<sup>3</sup> Nährlösung mit 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01% MgSO<sub>4</sub> und 4% Glucose (pH : ± 7.0) schlug die Hefe, bei nicht allzu geringer Impfung, richtig an. Die Entwicklung resultierte im Auftreten eines tüchtigen, grauen Sedimentes. Nachdem ich eine Woche gezüchtet hatte bei 30° C, filtrierte ich den Inhalt des Kulturkolbens durch eine Seitz „Keimschicht“, worauf sämtliche Hefezellen zurückblieben.

Das vollkommen klare Filtrat wurde einige Zeit gut aufgeköcht um allen Alkohol und alle Kohlensäure, die sich gebildet hatten, zu vertreiben. Nach Abkühlung und Nachfüllung mit aqua dest. bis auf das ursprüngliche Volum, brachte ich die Flüssigkeit auf ein Saccharosegehalt von 15% und ein pH von ± 6.0. Die Hälfte der vorhandenen Flüssigkeit wurde durch eine Keimschicht, die andere Hälfte im Autoklaven sterilisiert. Beide Portionen wurden nun mit dem Bakterium geimpft.

Nachdem sie 3—4 Tage bei 30° C gestanden hatten, zeigten sie eine deutliche kolloidale Trübung, während auf die Dauer das Medium sogar mässig viskös wurde. Die stärkste Entwicklung fand statt in dem Kolben, der bei 120° C sterilisiert worden war. Obwohl die Entwicklung noch weit hinter der im Hefewasser zurückblieb, war der Effekt doch deutlich genug um sagen zu können, dass aus den Hefezellen stammende Stoffe, welche die Entwicklung des Bakteriums günstig beeinflussen, im Medium anwesend gewesen sein müssen.

Unter Berücksichtigung des Resultates dieses Versuches wird es daher sehr annehmbar, dass auch in dem Tibi-Konsortium die Entwicklung von *Betabacterium vermiforme* günstig beeinflusst wird durch, von den Hefezellen stammende, organische Stickstoffverbindungen, inkl. der erforderlichen Bioaktivatoren.

Dies wird besonders in den Fällen deutlich hervortreten, wo sich das Konsortium in einem Medium befindet, das arm ist an organischen Stickstoffverbindungen. Daher unterliegt es keinem Zweifel, dass die im § 2 dieses Kapitels mitgeteilten Beobachtungen bezüglich der besseren



Entwicklung des Konsortiums als der Reinkultur des Bakteriums in dem erwähnten synthetischem Milieu, zu einem beträchtlichen Teile der Stickstoffversorgung des Bakteriums durch die Hefe zugeschrieben werden muss.

In diesem Zusammenhang möchte ich noch mal zurückkommen auf die in Kapitel VI, § 3, beschriebenen Beobachtungen von WARD, der in Tropfenkulturen Stäbchen aus ihren Kapseln schlüpfen sah und dabei feststellte, dass nur bei Anwesenheit von Hefezellen erneute Einkapselung stattfand. WARD meint hieraus schliessen zu müssen, dass das Ausschlüpfen aus den Kapseln der Einwirkung des freien Sauerstoffes und das sofort Neu-Einkapseln des Individuums bei Anwesenheit von Hefezellen der Entziehung des Sauerstoffes zugeschrieben werden müssen.

Die Einkapselungserscheinung möchte ich aber eher als eine Folge des günstigen Einflusses der Hefe hinsichtlich der Ausscheidung von organischen Stickstoffverbindungen, bezw. von Kohlensäure, betrachten.

Im Anschluss an das Vorhergesagte möchte ich nicht unterlassen zu erinnern an die schon mehrmals in der Literatur erwähnte Tatsache, dass Hefen im grossen und ganzen eine „konservierende“ Wirkung auf sehr verschiedene Milchsäurebakterien haben, m.a.W. dass Flüssigkeitskulturen dieser Bakterien länger lebensfähig bleiben, wenn gleichzeitig eine Hefeart daneben geimpft wurde.

SACCHETTI (1936) fand *Leuconostoc mesenteroides* in Mischkultur mit einer aus Froschlaiche isolierten Hefe nach 10 Monaten noch lebensfähig, während die Reinkultur schon nach 1 Monat steril war.

Bei Mischkulturen von *Streptokokken* mit Hefe zeigte sich diese Erscheinung ebenfalls.

#### § 5. BEGÜNSTIGT *BETABACTERIUM VERMIFORME* DIE ENTWICKLUNG DER HEFE?

In den vorhergehenden Paragraphen ist wahrscheinlich gemacht, dass der Bakterienkomponent im Konsortium einen bedeutenden Vorteil erfährt durch die Anwesenheit der Hefe.

Wir können uns nun die Frage stellen, ob dieser Vorteil gegenseitig ist, m.a.W. ob die Entwicklung der Hefe günstig beeinflusst wird durch das Bakterium.

In diesem Zusammenhang ist zu bemerken, dass unter natürlichen Bedingungen die saure Reaktion, welche unter dem Einfluss des Bakteriums schnell in der Nährflüssigkeit entsteht, die Entwicklung vieler anderer Bakterien ausschliessen und dadurch die Hefeentwicklung

begünstigen wird. Dem steht dann gegenüber, dass das Bakterium selbst der Hefe Konkurrenz macht, was den Verbrauch des erforderlichen Dissimilationssubstrats; des Zuckers anbelangt. Es steht jedoch wohl fest, dass die Hefezellen gut gedeihen im Konsortium und hierin also offenbar keinen zu grossen Nachteil von dem Bakterium erfahren.

Es muss auf Grund des Vorhergehenden zugegeben werden, dass der Vorteil, den die Hefe vom Zusammenleben mit dem Bakterium hat, noch einigermassen problematisch ist.

#### § 6. ÜBER DAS WESEN DER TIBI-SYMBIOSE.

In obigen Ausführungen ist der Ausdruck Symbiose lediglich in der wörtlichen Bedeutung von Zusammenleben gebraucht.

Es ist jedoch in der Biologie gebräuchlich das Wort Symbiose zu reservieren für diejenigen Typen des Zusammenlebens, wobei die fraglichen Organismen aus diesem Zusammenleben gegenseitig Nutzen ziehen. Wir wollen also hier die Frage stellen, ob ein Grund vorhanden sei zur Annahme, dass die Tibi-Körner auch in dieser engeren Bezeichnung einen Fall von Symbiose darstellen. Diese Frage kann nur beantwortet werden im Lichte unserer allgemeinen Kenntnis des Symbiose-Phänomens. Ohne hierauf näher eingehen zu wollen — ich verweise hierzu z.B. auf die Monographie von CAULLERY (1922) — darf wohl gesagt werden, dass man allmählich eine grosse Anzahl von Symbiosefällen (im wörtlichen Sinne) kennen gelernt hat, welche so ziemlich eine kontinue Übergangsreihe bilden vom ausgesprochenen Parasitismus bis zur „echten“ oder mutualistischen Symbiose.

Diese Übergangsformen sind nun dadurch gekennzeichnet, dass einerseits kein schädlicher Einfluss auf einen der Symbionten festzustellen ist, während andererseits ebenso wenig mit Sicherheit behauptet werden kann, dass *beide* Symbionten von dem Zusammenleben profitieren. Für diejenigen Fälle, wobei der günstige Einfluss des Zusammenlebens nur einem der Organismen zu Gute kommt (einseitige Symbiose) hat man wohl spezielle Bezeichnungen eingeführt. So hat SCHNEIDER (Vergl.: ENGLER-PRANTL 2e. Aufl., 8e. Band 1926) hierfür den wenig glücklichen Ausdruck *Nutrizismus* eingeführt.

CAULLERY spricht hierbei von *Kommensalismus*, während auch noch ein dritter Ausdruck: *Synökie* in der Literatur vorkommt (vergl. hierfür z.B. REICHENSPERGER im Handwörterbuch der Naturwissenschaften Bd IX, 1913, S. 921).

Hierzu muss aber bemerkt werden, dass man sich in der Praxis meistens



nicht genau an diese Begriffsbestimmung hält und CAULLERY z.B. auch Fälle mit einem einseitig, gering mutualistischen Einschlag noch zum *Kommensalismus* rechnet.

Für bestimmte, ebensowenig scharf umgrenzte Fälle, wobei die Symbiose wohl unverkennbar mutualistisch ist, aber der Vorteil für einen der Symbionten beträchtlich überwiegt, hat SCHWENDENER den Ausdruck *Helotismus* eingeführt. Man berücksichtigt dann, dass die Sicherstellung des Fortbestehens desjenigen Symbionten, der den Vorteil verschafft, vor allem von Bedeutung ist für den nutzniessenden Symbionten, eine Situation, welche im Worte *Helotismus* richtig zum Ausdruck kommt.

Wenn wir nun die Tibi-Symbiose betrachten, dann dürfen wir auf Grund der in den vorherigen Paragraphen beschriebenen Versuche sicher schliessen, dass die Hefe unter verschiedenen Verhältnissen einen unverkennbar günstigen Einfluss ausübt auf die Entwicklung des Bakteriums.

Die Versuche haben ergeben, dass Kohlensäure in niedriger Konzentration einerseits unentbehrlich ist um das Wachstum des Bakteriums auszulösen und dass andererseits das einmal angefangene Wachstum — als auch die Produktion des Wandstoffes — durch etwas höhere Kohlendioxidkonzentration in der umgebenden Atmosphäre deutlich gefördert wird.

Dieser Tatsache darf der günstige Einfluss der Hefe auf das Bakterium gewiss zum Teil zugeschrieben werden.

Andererseits hat sich herausgestellt, dass in einer synthetischen Nährlösung mit Ammoniumstickstoff das Wachstum einer Reinkultur des Bakteriums sehr günstig beeinflusst wurde durch eine vorherige Entwicklung der Hefe. Dieses Resultat muss unzweifelhaft der Tatsache zugeschrieben werden, dass die Hefe im Medium organische Stickstoffverbindungen, welche für das Bakterium, bei ausschliesslicher Anwesenheit von anorganischem Stickstoff unentbehrlich sind, ausscheidet.

Da es andererseits Zweifel unterliegt, ob das Bakterium fördernd wirkt auf die Entwicklung der Hefe, ist die Tibi-Symbiose wahrscheinlich am besten als einen Fall von *Kommensalismus* oder *Synökie* zu betrachten.

Schliesslich muss hier noch eine andere Frage in Betracht gezogen werden. In dem Vorhergehenden sind die Tibi-Körner als das Produkt des Zusammenlebens von *Betabacterium vermiforme* und *Saccharomyces intermedius* wiederholt als *Konsortium* angedeutet. Es ist jedoch zweifelhaft, ob der Gebrauch dieses Ausdrucks, den man auch schon bei BLUMER antrifft, genau genommen, berechtigt ist.

REINKE (1894), der diesen Ausdruck für das Zusammenleben von Alge und Pilz, sowie dieses in den Flechten realisiert ist, einführt, ist offenbar



geneigt, diesen zu reservieren für diejenigen Fälle, in denen die zusammenlebenden Organismen eine neue, selbständige morphologische Einheit bilden.

Ist diese Bedingung nun auch bei den Tibi-Körnern erfüllt? Für die Beantwortung dieser Frage muss in erster Linie darauf hingewiesen werden, dass man beim Tibi-Korn schwerlich von einer spezifisch inneren Struktur, bezw. von einer spezifisch äusseren Form sprechen kann. Ist doch die Verteilung der Hefe in und auf dem Korn gar nicht planmässig.

In Anbetracht der Tatsache, dass über das natürliche Vorkommen der Tibi-Körner eigentlich alle Angaben fehlen, kann man die Möglichkeit nicht ausschliessen, dass alles bisher studierte Tibi-Material einen und denselben natürlichen Ursprung hat und daraus durch Menschenhand weitergezüchtet ist. Damit wäre dann gesagt, dass wir in den Tibi-Körnern mit einer rein zufällig eingetretenen Assoziation zweier freilebender Mikroorganismen zu tun hätten.

Auch dieser Gesichtspunkt macht es nun eigentlich zweifelhaft, ob das Tibi-Korn strikt genommen unter dem Begriff des Konsortiums falle, wie dies durch REINKE definiert ist.

Jedoch kann man darauf hinweisen, dass im Tibi-Korn doch auch wohl einige Äusserungen einer spezifischen Morphologie zu finden sind. Ich erinnere dafür an das typische Vorkommen der im Tibi-Korn anwesenden Bakterienkapseln: ihre ausgesprochene Schlangenform, ihre Schlankheit und ihre scharfe Umgrenzung (feste Konsistenz des Wandstoffes).

Zieht man dies alles in Betracht und ferner auch, dass Untersuchungen betreffs des natürlichen Vorkommens des Tibi-Produktes wohl noch mal zu Überraschungen führen können, dann scheint es wohl zulässig um auch für dieses Produkt der Assoziation zweier Mikroorganismen vorläufig den Ausdruck *Konsortium* zu gebrauchen.

---

## KAPITEL VIII.

### DER WANDSTOFF VON *BETABACTERIUM VERMIFORME* UND DESSEN EIGENSCHAFTEN.

#### § 1. DIE BEREITUNG DES WANDSTOFFES IN PULVERFORM.

Zur Bereitung einer grösseren Menge Wandstoff in Pulverform, impfte ich 800 cm<sup>3</sup> Hefewasser-15% Saccharose (ohne Kreide) mit einigen cm<sup>3</sup> einer viskösen Reinkulturflüssigkeit. Da Gel-Bildung vermieden werden sollte, wurde die Kultur oftmals gut geschüttelt.

Der ganze Kolbeninhalt war schon nach 4 Tagen (30° C) in eine sehr dicke, visköse Masse verändert und enthielt zahlreiche Kohlensäuregasblasen.

Bevor ich nach 14 Tagen den Wandstoff einer weiteren Behandlung unterzog, machte ich mit 10 cm<sup>3</sup> eine quantitative Bestimmung und zwar mit der Alkohol-Präzipitierungsmethode von TARR und HIBBERT (1931).

Auf diese Weise fand ich als Trockengewicht 0,501gr, was bedeutet, dass ungefähr ein Drittel des ursprünglichen Saccharosegewichtes in der Form eines allerdings unreinen Wandstoffes zurückgefunden wurde.

Zur Verarbeitung des Wandstoffes in Pulverform benützte ich die von BEIJERINCK (1912, A) für die Dextranbereitung aus *Betacoccus arabinosaceus* verwendete Methode. Der gesamte Kolbeninhalt wurde in ein grosses Becherglas übergossen und mit 96% Alkohol genau auf einen Gehalt von 50% gebracht.

Unter sorgfältigem Umrühren entstand ein voluminöses, elastisches, teigartiges Präzipitat, welches nach dem Sinken mit der Hand ausgedrückt werden konnte. Nach nochmaligem gründlichem Nachspülen mit 50% Alkohol liess ich die Substanz bei 45° C trocknen. Zur weiteren Reinigung wurde alles wieder in kochendem Wasser zu einer egalen kleisterartigen Masse verrieben. Das Ganze wurde in einen Buchner-Trichter gebracht und zweimal mit kochendem Wasser gewaschen um alle in Wasser löslichen Stoffe zu entfernen. Hierauf wurde wieder soviel Alkohol (96%) zugesetzt, bis eine 50% Lösung zustande kam.

Nach dem Abfiltrieren, Nachspülen und Trocknen des Präzipitates wurde die Masse zu Pulver zerrieben und dieses weisslich-lichtgraue, hygroskopische Pulver bei 45° C aufgehoben.

Bei diesem Vorgehen wurde also einer weitgehenden Reinigung des Produktes von löslichen Kohlehydraten, (event. Reste von Saccharose, Glucose, Fructose) nachgestrebt. Allerdings werden bei dieser Methode die eigentlichen Bakterienkörper, d.h. die darin vorkommenden, in Wasser und in 50% Alkohol unlöslichen Bestandteile — hauptsächlich also Eiweissstoffe und deren höhere Abbauprodukte — nicht entfernt. Zur Erlangung eines vorläufigen Eindruckes der Wandstoffzusammensetzung schien diese zurückbleibende Verunreinigung nur von geringer Bedeutung.

## § 2. EINIGE EIGENSCHAFTEN DES WANDSTOFFPRÄPARATES.

Das auf die soeben beschriebene Weise erhaltene Pulver war selbst nach langem Kochen in Wasser nur sehr wenig löslich. Die FEHLING'sche Reaktion war negativ, während Jod keine Blaufärbung gab.

Im Anschluss an Mitteilungen früherer Forscher über den Wandstoff von *Leuconostoc mesenterioides* versuchte ich mein Produkt in verdünnter Lauge in Lösung zu bringen. Inwieweit hiermit aber eine mehr oder weniger eingreifende Veränderung des Produktes zusammengeht, muss unentschieden bleiben.

Eine kleine Quantität von diesem Produkt wurde längere Zeit mit kochendem Wasser behandelt, bis es zu einer flockigen Masse aufgequollen war. Nach Abkühlen wurde dann soviel 10% Kalilauge hinzugefügt, bis eine finale Laugenkonzentration von 3—4% erreicht war.

Schon bei einer Konzentration von 0.015% des Pulvers entstand eine blau-opalisierende Flüssigkeit. Obwohl es unmöglich war eine spezifische Drehung dieser nur wenig durchsichtigen Flüssigkeit genau zu bestimmen, erwies sie sich doch deutlich rechtsdrehend.

In einer 0.1% Lösung konnte ich unter Zuhilfenahme einer 1 dm langen Röhre den annähernden Wert der Drehung ablesen. Sie betrug ungefähr  $+0.18$  —  $+0.21^\circ$ , aus der sich die spezifische Drehung dieser Wandstofflösung auf etwa 180 bis  $210^\circ$  berechnen lässt.

Unter Anwendung der Säurehydrolyse wurde hierauf untersucht, aus welchen Bausteinen der Bakterienwandstoff zusammengesetzt ist. Es erwies sich, dass bei der unten beschriebenen Hydrolysemethode eine Lösung erhalten wurde, welche die FEHLING'sche Lösung kräftig reduzierte.

Die Art des gebildeten Zuckers wurde durch quantitative Reduktionsbestimmungen, kombiniert mit polarimetrischen Bestimmungen, näher untersucht. Schliesslich wurden die Ergebnisse noch mit der quantitativen Vergärungsmethode verifiziert.



Zur Hydrolyse benützte ich die Methode, welche das „Warenwet (Jam en Limonade Besluit)“ zur quantitativen Hydrolyse des Dextrins vorschreibt.

Nach einigen orientierenden Proben, konnte ich jedoch feststellen, dass die Zeit des Erhitzens in diesem Falle ziemlich verkürzt werden konnte, ohne dass hierdurch das Reduktionsvermögen des Hydrolysates beeinträchtigt wurde.

Dies brachte mich schliesslich zur folgenden Methode: 500 mgr Pulver wurden abgewogen und dann der Hydrolyse unterzogen, indem wir es 70 Minuten hindurch in 50 cm<sup>3</sup> 3% HCl an einem Rückflusskühler gelinde kochten. Nachher wurde die lichtgelb gefärbte Lösung mit 10% KOH neutralisiert; hierauf wurde das Ganze unter Nachspülen in einen Kolben von 100 cm<sup>3</sup> gegossen und mit aqua dest. auf 100 cm<sup>3</sup> aufgefüllt.

In der Flüssigkeit wurde beim Gebrauch einer 2 dm langen Polarisiermeterröhre eine Rechtsdrehung von 0,52° festgestellt. Nimmt man an, dass ausschliesslich Glucose vorhanden ist,  $[\alpha]_D = 52,5^\circ$ , dann folgt hieraus, dass 495 mgr Glucose pro 100 cm<sup>3</sup> vorhanden sein würden. Dies besagt denn auch, dass in diesem Falle aus 500 mgr Wandstoffpräparat 495 mgr Glucose gebildet worden sind.

In zweiter Linie wurde von dem auf 100 cm<sup>3</sup> verdünnten Hydrolysat die FEHLING-Reduktion nach SCHOORL bestimmt.

Die mittleren Werte aus mehreren Bestimmungen ergaben: 10 cm<sup>3</sup> Flüssigkeit verbrauchten 14,12 cm<sup>3</sup> 0,1049 N, oder 14,81 cm<sup>3</sup> 0,1 N Thiosulfat. Nach der Tabelle bezieht sich dies auf 48,6 mgr Glucose, was also bedeuten würde, dass aus 500 mgr Wandstoff 486 mgr Glucose entstanden sein sollen.

Die befriedigende Übereinstimmung dieser Resultate mit jenen oben erhaltenen polarimetrischen lässt uns zu dem Schluss kommen, dass bei der Hydrolyse in der Tat Glucose als einziger Zucker entstanden ist.

Um hierüber noch grössere Sicherheit zu bekommen, wurde ebenfalls eine biochemische Analyse nach der Gärungsmethode unternommen.

Hierzu wurde das im Masskolben zurückgebliebene Quantum bis zu Trocken eingedampft und dieser Rest in Hefewasser bis auf 15 cm<sup>3</sup> aufgelöst. (Das pH betrug 6.0). 1 cm<sup>3</sup> dieser Flüssigkeit wurde in dem quantitativen Vergärungsapparat von VAN ITERSOM-KLUYVER vergoren. Das Volum der gebildeten Kohlensäure wurde abgelesen und hernach auf 0° C und 760 mm umgerechnet. Für die gelöste Kohlensäure wendete ich die von KLUYVER angegebene Korrektur von 1,2 cm<sup>3</sup> Kohlensäure an

(1914)<sup>1)</sup>. Um sicher zu sein, dass nicht etwa vorhandene schädliche Stoffe die Gärung behindern, wurde zur Kontrolle in einem zweiten Apparate 1 cm<sup>3</sup> mit einer Zugabe von 20 mgr Glucose vergoren. Die Gärung fand mit einer Reinkultur von *Saccharomyces cerevisiae* (Presshefe) statt.

Das totale auf 0° C und 760 mm umgerechnete Kohlensäurevolum betrug im ersten Apparate 4,30 cm<sup>3</sup>, welcher Wert mit 17,2 mgr Glucose übereinstimmt. Die FEHLING'sche Reaktion an der ausgegorenen Flüssigkeit angestellt, war negativ.

Im zweiten Apparat betrug das gesamte auf 0° C und 760 mm umgerechnete Kohlensäurevolum 9.30 cm<sup>3</sup>. Ziehen wir hiervon die 4.30 cm<sup>3</sup> des ersten Apparates ab, dann folgt hieraus, dass aus den hinzugefügten 20 mgr Glucose 5.0 cm<sup>3</sup> (auf 0° C und 760 mm umgerechnet) frei kamen. Die zu erwartene Menge wurde also gebildet, ein Beweis, dass die Vergärung selbst im zweiten Apparat quantitativ verlaufen war.

Von dem eingedampften Hydrolysat wurde sowohl vor als auch nach erfolgter Gärung die reduzierende Wirkung auf die FEHLING'sche Lösung festgestellt.

Hieraus ergab sich, dass der Rückgang in Reduktionswert, welcher von der Gärung bewirkt war, in der Annahme, dass nur Glucose vergoren worden ist, 16.25 mgr dieser Zuckerart entsprach. Dieser Betrag stimmt in befriedigender Weise mit dem Wert 17.2 mgr überein, den wir aus den Ergebnissen der quantitativen Vergärung berechneten.

Auch dieses Resultat unterstützt daher die bereits gemachte Schlussfolgerung, dass das Wandstoffpräparat bei der Säurehydrolyse nur Glucose auf liefert.

### § 3. ÜBER DIE NATUR DES WANDSTOFFES.

Die im vorigen Paragraphen mitgeteilten Resultate über die Hydrolyse des Wandstoffpräparates lassen nicht daran zweifeln, dass der Wandstoff von *Betabacterium vermiforme* zu den Polysacchariden gerechnet werden muss. Weiterhin ist zu bedenken, dass die quantitative Untersuchung der optischen Drehung, des Reduktionsvermögens und der Vergärbarkeit

---

<sup>1)</sup> Im Delfter Institut hat sich schon lange herausgestellt, dass dieser Wert eigentlich etwas zu hoch ist. Die Erfahrung aber lehrt, dass bei der Annahme dieses Wertes bei gleichzeitigem Gebrauch der durch KLUYVER festgestellten Umrechnungskonstanten nur sehr geringe Fehler gemacht werden. Will man die tatsächlichen Werte für die gelöste Kohlensäure anwenden, dann müssen erst andere Umrechnungsfaktoren festgestellt werden.



des Hydrolysats zum Schlusse führt, dass Glucose der in quantitativer Hinsicht weitaus wichtigste Baustein des Wandstoffes ist. Doch braucht hieraus noch nicht geschlossen zu werden, dass Glucose nun auch der *einzig*e Baustein des betreffenden Polysaccharids ist.

Falls dieses tatsächlich die empirische Formel  $(C_6H_{10}O_5)_n$  besitze, hatte doch bei der quantitativen Hydrolyse aus 500 mgr Wandstoff 550 mgr Glucose entstehen müssen, während in Wirklichkeit maximal 495 mgr Glucose aufgefunden wurden. Dieses Manko lässt die Möglichkeit offen, dass im Wandstoff neben Glucose ein oder mehrere andere Bausteine vorhanden sind.

Das Manko bei der Hydrolyse kann aber auch darauf zurückzuführen sein, dass das Präparat nur bei niederer Temperatur ( $45^\circ C$ ) getrocknet war und daher noch Wasser enthielt. Auch kann durch die unvermeidliche Erhitzung bei der Hydrolyse eine geringe Zerstörung von Glucose stattgefunden haben. Dies unterstützen einige, bei der Hydrolyse von Stärke gemachte Beobachtungen. Wenn man also vorläufig annimmt, dass der Wandstoff von *Betabacterium vermiforme* ein Glucosepolymer ist, dann wird man sofort an die Tatsache erinnert, dass man auch bei dem so oft schon untersuchten Wandstoff von *Leuconostoc mesenteroides* zum gleichen Schluss gekommen ist.

Im Vorhergehenden haben wir schon des öftern auf die grosse Übereinstimmung der Wandstoffe bei den beiden Bakterienarten hingewiesen. Am stärksten kommt diese Übereinstimmung dadurch zum Ausdruck, dass merkwürdigerweise in beiden Fällen die Wandstoffbildung streng an das Vorhandensein von Saccharose im Nährmedium gebunden ist, während im Wandstoff doch nur Glucose als Baustein vorkommt.

Die bereits schon lange bekannte Tatsache, dass weder Glucose, noch Invertzucker zur Wandstoffsynthese zu gebrauchen ist, entbehrt noch immer einer Erklärung.

Angesichts dieser Lage ist der Schluss berechtigt, dass der Wandstoff von *Betabacterium vermiforme* zu derselben Klasse von Verbindungen gehört als der Wandstoff von *Leuconostoc mesenteroides*, an welchem man den Namen *Dextran* gegeben hat.

Es wird diese Auffassung ausserdem noch durch die ungefähre Bestimmung des optischen Drehungswertes verdünnter Lösungen in Lauge unterstützt. Bei von LIPPMANN (1904) findet man doch für die spez. Drehung von *Leuconostoc*-Dextran in laugenhaltigen Lösungen auseinandergelungene Werte, die zwischen  $+195^\circ$  und  $+227^\circ$  liegen.

Jedoch müssen tiefergehende Untersuchungen über die chemische



Konfiguration und die molekulare Struktur der beiden Wandstoffe — u.a. unter Hinzuziehung der *Röntgen*-Untersuchung — die Frage beantworten, wie weit die Übereinstimmung zwischen beiden Polysacchariden geht <sup>1)</sup>.

---

<sup>1)</sup> Mit einer derartigen Untersuchung ist inzwischen von Dr. M. STACEY in Birmingham ein Anfang gemacht worden; die dabei erhaltenen Resultate werden wahrscheinlich bald publiziert.

## KAPITEL IX.

### BAKTERIELLE HYDROLYSE DES TIBI-DEXTRANS.

#### § 1. ISOLIERUNG EINES DEXTRANHYDROLYSIERENDEN BAKTERIUMS.

Eines Tages beobachtete ich zufälligerweise, dass nicht sterilisierte, in strömendem Wasser gut gespülte und im Eisschrank aufbewahrte Tibi-Klümpchen nahezu ganz in eine ziemlich dünne, trübe Flüssigkeit verändert waren.

Deutlich war eine Trennung in ein unlösliches, breiiges Sediment, das noch Reste in Auflösung befindlicher Klümpchen enthielt, und in einer trüben darüberstehenden Flüssigkeit festzustellen. Die Vermutung, dass sich dieser Prozess schneller abspielen würde, wenn man die Körner bei 30° C stehen lässt, traf zu. Die schönen, harten Dextransklümpchen fielen langsam ein und wurden zusehends feuchter und breiiger, während gleichzeitig die Kontouren der Klümpchen undeutlicher wurden. Bereits nach zwei bis drei Wochen war das Volum auf die Hälfte verringert und konnte die breiige dünne Masse durchgeschüttelt werden.

Im mikroskopischen Bild erschienen in der Flüssigkeit zahlreiche grösstenteils tote Hefezellen und stäbchenförmige Individuen des Tibi-Bakteriums. Gleichzeitig fielen mir jedoch zahlreiche bewegliche und aufgeschwollene sporenführende Stäbchen auf. Es entstand hierdurch die Vermutung, dass eine als Infektion aufgetretene Bakterienart für die Verflüssigung der Tibi-Klümpchen verantwortlich war.

Im Zusammenhang hiermit sei auf BEIJERINCK (1912, A) verwiesen, welcher bereits feststellte, dass der Wandstoff von *Leuconostoc mesenterioides* von verschiedenen sporenführenden Bakterien angegriffen werden kann. Auch SACCHETTI stellte neulich fest, dass das sporenführende Bakterium *Bacillus vulgatus* imstande ist den genannten Wandstoff anzugreifen.

Ich strich daher eine nicht zu sehr verdünnte Suspension dieses Breies auf eine Peptonagarplatte und bebrütete sie bei 35° C. Dies ergab ein nahezu einheitliches Bild kleiner, ziemlich dünner, wässrig-durchsichtiger Kolonien (1 mm), welche auf einigen feuchten Stellen Ausläufer bildeten.

Dieser auf genannten Boden zur Reinkultur gebrachte Organismus wurde auf seine wandstoffangreifende Wirkung geprüft. Nach Impfung dieses Bakteriums in Röhrchen mit sterilisierten Tibi-Klumpchen fand ein kräftiger Abbau der Masse statt<sup>1)</sup>.

## § 2. EIGENSCHAFTEN UND IDENTIFIZIERUNG DER ISOLIERTEN BAKTERIENART.

Im mikroskopischen Präparat sehr junger Kulturen zeigten sich meist kleine, gerade bis leichtgebogene, sehr bewegliche und zum Teil paarweise auftretende Stäbchen. Nach Methylenblaufärbung zeigten sich oft viele auffallend dunkler gefärbte Granula.

In etwas älteren Kulturen von Peptonagarplatten war der grösste Teil der Bakterien zentral stark aufgeschwollen, infolge der Anwesenheit einer grossen, ovalen Spore.

Abgesehen von einigen Ausnahmen, ist das Auftreten von solchen Klostridien bei der Sporenbildung hier ein typisches Merkmal. Die Abmessungen der normalen Stäbchen lagen zwischen  $(1,5-5) \times (0,6-1) \mu$ . Für die Sporen betragen sie  $1,8-1,5 \mu$ .

Die Organismen sind Gram-negativ, katalase-positiv und besitzen peritriche Zilien (Färbung nach ZETNOW). Die Gelatineverflüssigung war negativ. Beim Vergleich der verschiedenen Nährböden stellte sich heraus, dass die Entwicklung auf Hefeagar -2% Glucose -2% Kreide besser war als auf Platten ohne Kreide. Das Vorhandensein von Glucose ist deshalb günstig, weil in der ersten Zeit die Sporenbildung unterdrückt wird.

Auf Glucose-Kreideboden entstehen trockengänzende, cremefarbige Kolonien von 1—1,5 mm, welche ziemlich platt sind und zentral etwas kegelförmig anschwellen. Ihre Konsistenz ist zäh-schleimig. Der Strichkultur auf Schrägagar mit Kreide führt zur Bildung eines dünnen elastischen Häutchens. Das mikroskopische Bild dieser trocken-zähen Masse zeigt uns amorphe Schleimflocken, in welchen viele Stäbchen eingebettet sind. Ausserhalb dieser Substanz sind die Stäbchen entweder nackt oder von einer Kapsel umgeben, welche bei dem einen sehr dünn und beinahe nicht zu unterscheiden ist, bei anderen wiederum deutlich und beträchtlich dicker ist ( $0,75 \mu$ ). Für eine auffällige Produktion dieses zähen Wand-

<sup>1)</sup> Im Delfter Laboratorium hat Ir. SOETERS (1936) weiter gezeigt, dass die Tibi-Körner ebenfalls völlig abgebaut werden unter dem Einfluss eines obligat-anaeroben Sporenbildners: *Bacillus cellulosaе dissolvens*, einer aus menschlichen Fäkalien isolierten Art.



stoffes ist das Vorhandensein von Kreide und Zucker bestimmt notwendig.

Bezüglich des Stoffwechsels wurde in erster Linie die Eigenschaft der Wandstoffhydrolyse untersucht. Zu diesem Zwecke impfte ich das Bakterium in Kolben von 300 cm<sup>3</sup> Inhalt mit 50 cm<sup>3</sup> Peptonwasser, in welchem vor der Sterilisation 2 Gramm getrocknete Tibi-Klümpchen zugefügt worden waren. Beim Züchten bei 35° C fand eine schnelle Entwicklung des Bakteriums statt, bald ging ein sichtbares Angreifen der Tibi-Klümpchen hiermit zusammen. Nach 5—6 Tagen waren diese vollständig verflüssigt, während auf dem Boden des Kolbens doch noch ein flockiges Sediment vorhanden war. Im gleichen Kulturmedium untersuchte ich die optimale Temperatur für die Wandstoffhydrolyse und zwar bei Temperaturen von: 50°, 45°, 40°, 37°, 35° und 30° C.

Als Optimaltemperatur kommt 40° C in Frage, obwohl 37° und 35° C in nichts davon abwichen. Falls keine andere Temperatur genannt wird, beziehen sich die folgenden Experimente auf 35°—37° C.

Fortgesetzte Untersuchungen lehrten, dass die Geschwindigkeit, womit die Tibi-Körner abgebaut wurden, nicht allein von der Temperatur, sondern auch in hohem Masse von der Aeration der Kultur abhängig war. Je grösser der Kolben ist, d.h. je grösser die Oberfläche der Kulturflüssigkeit wird, um desto schneller verschwinden die Tibi-Klümpchen; darum vollzieht die Hydrolyse sich in Kulturröhren langsamer.

Ausserdem untersuchte ich, inwiefern das Bakterium gärfähig ist und impfte hierzu die Kulturen in Gefässchen nach EINHORN, welche Peptonwasser mit 2% Glucose enthielten. Es trat keine Gasbildung auf, während das Wachstum hauptsächlich auf den offenen Arm beschränkt blieb.

Ferner wurde untersucht, wie verschiedene Zucker: Glucose, Fructose, Galactose, Saccharose, Maltose und Lactose in 1% Konzentration in Peptonwasser unter aeroben Bedingungen das Wachstum beeinflussten. Es zeigte sich, dass die Entwicklung nach dem Grade der Trübung beurteilt, bei den Disacchariden auffallend stärker war als bei den Monosacchariden (Vergl. auch Seite 88-89). Bei den letztgenannten war kaum ein Unterschied mit Kulturen in Peptonwasser allein zu sehen.

Dieser kennzeichnende Unterschied kann nicht dem gemeinsamen Sterilisieren von Peptonwasser und den Zuckerarten zuzuschreiben sein, da beim gesonderten Sterilisieren das gleiche Resultat auftritt.

Wurden Kulturkolben mit Peptonwasser 1% Glucose oder mit Peptonwasser und sterilisierten Tibi-Klümpchen nach dem Impfen mit dem Bakterium unter anaeroben Bedingungen belassen, dann war nach Be-

brütung bei 37° C selbst nach 3 Wochen weder von einer Entwicklung noch von einer Körnerverflüssigung etwas zu bemerken. Als ich nach dieser Zeit der Luft Zutritt verschaffte, trat sofort eine gute Entwicklung ein. Nach einer Periode von 3 Wochen habe ich in der genannten Peptonwasser-1% Glucose-Kultur eine quantitative Bestimmung des Glucoseverbrauches und der Säurebildung angestellt. 0,41% Glucose waren innerhalb dieser Zeit verschwunden, während die Azidität nur gering war, 0,40 m<sup>3</sup> N pro 100 cm<sup>3</sup> Kulturflüssigkeit.

An der Hand aller diesen Kriterien bestand kein Zweifel, dass das untersuchte Bakterium zur grossen Gruppe der aeroben, sporenbildenden Bakterien der Gattung *Bacillus* gehörte.

Eine systematisch durchgeführte Untersuchung zur Identifizierung des isolierten Bakteriums mit einer der zahlreichen bereits beschriebenen Arten dieser Gattung, muss heutzutage als undurchführbar gelten. Man kann nur feststellen, dass das Bakterium nicht identisch ist mit einer der besser bekannten Arten der Gattung *Bacillus*. Hiergegen sprechen verschiedene Eigenschaften insbesondere das Auftreten von *Clostridium*-Formen während der Sporulation. In dieser Hinsicht zeigt sich mehr Übereinstimmung mit *Aerobacillus polymyxa* und *Zymobacillus macerans* (siehe KLUYVER und VAN NIEL, 1936), obwohl sich das neue Bakterium von diesen Arten wiederum durch das Fehlen einer Gärung deutlich unterscheidet. Da von diesen Arten bekannt ist, dass sie verschiedene Pflanzengewebe zum Zerfall bringen, schien mir eine Untersuchung inwieweit sie ebenfalls den Wandstoff der Tibi-Klümpchen anzugreifen vermögen, erwünscht. Deshalb wurden Reinkulturen beider Bakterienarten in Kolben mit Peptonwasser und Tibi-Klümpchen geimpft; jedoch zeigte sich auch auf die Dauer kein Zerfall der Klümpchen.

Mehr versprach ich mir von einem Vergleich der neu isolierten Art mit den Beschreibungen einiger Stämme aerober, sporenbildender Bakterien, welche in den letzten Jahren hinsichtlich ihrer Eigenschaft den Wandstoff bestimmter anderer Bakterien — insbesondere von *Pneumococcus*-Typen — aufzulösen, von sich reden machten. Die ersten Forscher, die eine solche *Bacillus*-Art isolierten, waren DUBOS und AVERY (1931). Sie isolierten aus dem Boden der „cranberry bogs of New Jersey“ ein bewegliches, sporenbildendes Bakterium, welches die Fähigkeit besass um das kapsulare Polysaccharid der virulenten S-Variante Typus III *Pneumococcus* abzubauen. Injizieren vom aus den Kulturen der sporenbildenden Bakterien bereiteten, hydrolysierenden Enzym in Versuchstiere, welche mit lebenden, virulenten *Pneumococcen* vorher infiziert waren, bracht



einen Schutz dieser Tiere zuwege. Übereinstimmende, wahrscheinlich selbst identische Stämme dieser sporenbildenden Bakterien, welche ebenfalls den Wandstoff der genannten *Pneumococcus*-Typen auflösen, wurden später von SICKLES und SHAW isoliert und ausführlich beschrieben (1933 und 1934).

Diese Forscher vereinigen die von ihnen isolierten Stämme in einer neu aufgestellten Art, der sie den Namen *Bacillus palustris* geben. Da die Beschreibung dieser Art in befriedigender Weise mit der oben von mir für meinen Stamm gegebenen übereinstimmt, scheint mir eine vorläufige Einordnung in die Art *Bacillus palustris* vollauf angebracht.

Zu einer vollständigen Identifizierung kann allerdings erst geschritten werden, wenn sich herausstellen würde, dass die Stämme der amerikanischen Forscher imstande sind das Tibi-Dextran aufzulösen und umgekehrt mein Stamm auch das Typus III *Pneumococcus* Polysaccharid aufzulösen vermag. In dieser Hinsicht ist aber ein gewisser Vorbehalt zu betrachten, da die Wirkung der hydrolysierenden Bakterien von den amerikanischen Forschern als streng spezifisch für das Polysaccharid des Typus III *Pneumococcus* beschrieben wird: sogar die Polysaccharide der Typen I und II werden nicht angegriffen.

Ausserdem steht fest, dass die Wandstoffe der *Pneumococcen* in chemischer Hinsicht vom Tibi-Wandstoff abweichen, denn in den *Pneumococcen*-Wandstoffen sind Uronsäure-Bausteine mit Sicherheit nachgewiesen worden. Um aber das Aufstellen neuer überflüssiger Arten zu vermeiden, will ich das von mir isolierte Bakterium bis auf weiteres als *Bacillus palustris* bezeichnen.

### § 3. HYDROLYSE DES GEREINIGTEN DEXTRANPRÄPARATES DURCH *BACILLUS PALUSTRIS*.

Wie bereits bemerkt wurde, ist das gereinigte Dextranpräparat in kaltem Wasser gar nicht, in kochendem Wasser nur sehr wenig löslich. Um nun festzustellen, wie schnell eine bestimmte Gewichtsmenge des pulverförmigen Dextrans von *Bacillus palustris* hydrolysiert (aufgelöst) werden kann und inwieweit gleichzeitig vorhandene Glucose auf die Hydrolyse von Einfluss ist, stellte ich folgenden Versuch an.

In Kolben von 100 cm<sup>3</sup> Inhalt brachte ich neben 40 cm<sup>3</sup> Peptonwasser (pH : 7,4): bzw. 50 mgr, 200 mgr, und 400 mgr Dextran. Ausserdem wurden noch zwei Kolben mit der gleichen Menge Peptonwasser fertig gestellt, an welche unterschiedlich 200 mgr Dextran mit 1% Glucose und 200 mgr lösl. Stärke zugefügt wurden. Nach dem Sterilisieren befand



sich das Dextran als ein umfangreiches, flockiges Sediment am Boden des Kolbens, während die Stärke gelöst war. Nach der Impfung mit einer jungen Kultur zeigte sich, dass die 50 mgr in 4, die 200 mgr in 6 und die 400 mgr Dextranpulver in 7 Tagen verschwunden waren. In der Kultur mit der 1%-igen Glucoselösung war das Sediment hingegen, trotz einer deutlichen Entwicklung des Bakteriums, unberührt geblieben. Nachdem das Sediment vollständig verschwunden war, zeigte sich, dass 5 cm<sup>3</sup> des trüben Mediums in den obengenannten Kolben eine positive FEHLING'sche Reaktion ergaben. Eine Ausnahme machte die Hydrolyseflüssigkeit von 50 mgr, bei der mindestens 20 cm<sup>3</sup> zur Erzielung einer sichtbaren Reaktion nötig waren. Es zeigte sich, dass die Stärke ebenfalls hydrolysiert worden war; der Organismus verfügt also ebenfalls über eine Amylase.

Aus der Beobachtung, dass der Abbau des Dextrans nicht stattfindet, wenn gleichzeitig Glucose vorhanden ist, lässt sich schliessen, dass das Hydrolyse verursachende Enzym nicht gebildet wird, wenn leichter zu verarbeitende Energiequellen zur Verfügung stehen.

Diese Erscheinung konnten auch DUBOS und AVERY für das bakterielle Enzym feststellen, das die *Pneumococcus*-Polysaccharidkapseln abbaut.

Ähnliche Versuche mit Mengen von 50 mgr und 200 mgr Dextranpulver wurden auch in mineralen Medien folgender Zusammensetzung angestellt: 0,2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,2% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,01% MgSO<sub>4</sub>, (pH : 7,4).

Auch bei dieser Untersuchung wurde ein Vergleich mit *Aerobacillus polymyxa* und *Zymobacillus macerans* durchgeführt, aber auch diesmal erfolgte mit diesen Arten kein Abbau. (Siehe BEIJERINCK en den DOOREN de JONG, 1923; SCHARDINGER, 1905 und DONKER, 1926).

Der Abbau des pulverförmigen Dextrans durch *Bacillus palustris* war durch eine Zone mit kolloidaler Trübung überhalb des an Dicke abnehmenden Sedimentes gekennzeichnet; sie wurde augenscheinlich durch die Bildung von Hydrolyseprodukten aus dem Dextran hervorgerufen. Der hemmende Effekt der Glucose war hier ebenfalls vorhanden.

Erwähnenswert ist, dass das von *Betabacterium vermiforme* gebildete Polysaccharid und das daraus durch bakterielle Hydrolyse erhaltene Dextrinpräparat (siehe § 4) als Kohlenstoffquelle weitaus günstiger war als Zucker. Höchstwahrscheinlich wird dies auch bei Anwesenheit von Pepton als Stickstoffquelle der Fall sein, obwohl sich dies schwieriger feststellen lässt.

Für *Bacillus palustris* können wir also eine Kohlenhydratreihe aufstellen, welche nach dem Grade der Tauglichkeit jedes einzelnen Kohle-

hydrates als Kohlenstoffquelle angeordnet ist und folgendermassen aussieht: Dextran, Dextrine, Disaccharide, Monosaccharide.

Im Zusammenhang hiermit sei erwähnt, dass SACCHETTI (1936) für *Bacillus vulgatus* etwas ähnliches feststellen konnte, denn er teilt mit, dass die Entwicklung dieses Bakteriums beim Vorhandensein von Dextran (von *Leuconostoc mesenterioides*) und Dextrin besser vor sich geht als mit Saccharose und Glucose.

#### § 4. EINIGE WEITERE BEOBACHTUNGEN ÜBER DIE BAKTERIELLE HYDROLYSE DES TIBI-DEXTRANS.

Es sei hier noch kurz etwas näher auf die bakterielle Hydrolyse des Tibi-Dextrans und auf die dabei gebildeten Produkte eingegangen.

Zur Erzielung einer genügend grossen Menge von Abbauprodukte wurde im Grossen vorgegangen und zwar gebrauchten wir als Ausgangsmaterial Tibi-Körner, welche stundenlang in strömendem Wasser gespült und hernach getrocknet wurden.

In einem  $\frac{1}{2}$  Liter Kolben sterilisierte ich 90 cm<sup>3</sup> Peptonwasser und 15 gr des getrockneten Materials. Das Medium hatte sich nach dieser Behandlung infolge der starken Quellung der Tibi-Klumpchen zu einer feuchten, unbeweglichen und kompakten Masse verändert; von einer freien Kulturflüssigkeit war keine Spur mehr zu finden. In diesem Zustande wurde der Kolben mit einer jungen Agarkultur von *Bacillus palustris* kräftig geimpft.

Der Verflüssigungsvorgang setzte schnell und intensiv ein. Nach 6 Tagen hatte sich das Ganze in einen dünnen Brei mit einem Sediment verändert, worin noch einige Reste von Tibi-Körnern zu sehen waren. Bei der Kontrolle am Ende der dritten Woche war in der grauen trüben Flüssigkeit ein feinflockiger Niederschlag mit einigen halbverflüssigten Tibi-Körnern vermengt zu beobachten.

Zur Trennung der aufgelösten von den nicht aufgelösten Stoffen zentrifugierten wir den Inhalt sorgfältig. Die mikroskopische Untersuchung der in den Zentrifugenröhren zurückgebliebenen Substanz enthielt neben einer grossen Menge von Bakterien, Sporen und Hefezellen auch noch freie und zusammengeballte schlangenförmige Kapseln.

Wie wir bereits in Kapitel V mitteilten, zeichneten sich diese freien Kapseln durch ihr klares und übersichtliches Bild aus, sodass Form und Abmessung um vieles besser zu erforschen waren als bei den Kapseln der kompakten Körner.

Von der kolloidal-trüben Flüssigkeit hielt ich eine kleine Menge zur



Bestimmung des pH und vergärbare Zucker zurück. Aus dem pH 5,2, welches elektrisch bestimmt wurde, war zu ersehen, dass nur eine geringe Säurebildung stattgefunden hatte. Zur Bestimmung event. vorhandener, vergärbare Zucker, benutzte ich den quantitativen Vergärungsapparat.

Es zeigte sich, dass nur sehr wenig gasförmige Kohlensäure erzeugt wurde ( $0,05 \text{ cm}^3$ ). Vergärbare Zucker waren also nur in sehr geringer Konzentration vorhanden.

In einem Kontrollapparat wurden zu  $1 \text{ cm}^3$  Flüssigkeit 20 mgr Glucose hinzugefügt; das Volum der bei der Gärung gebildeten gasförmigen Kohlensäure, auf  $0^\circ \text{ C}$  und 760 mm umgerechnet, betrug  $5,05 \text{ cm}^3$ . Auf Glucose umgerechnet bedeutet dies pro  $1 \text{ cm}^3$  Hydrolysat  $(5,05 + 1,2) \times 4 = 25 \text{ mgr}$ ; also muss in der zur Vergärung gebrachten Flüssigkeit 5 mgr vergärbare Zucker — als Glucose berechnet — vorhanden gewesen sein.

Zu der abzentrifugierten Flüssigkeit wurde nun ein gleiches Volum 96% Alkohol hinzugefügt, wobei sich ein Niederschlag in der Form einer gelblichen, zähen, teigförmigen Masse bildete. Dieses nur sehr geringe Präzipitat wurde nach dem Trocknen wieder in kochendem Wasser zu einer kolloidalen Lösung aufgerieben und hieraus wieder durch Alkoholbehandlung auf 50% ein Niederschlag erzeugt. Nach dem Trocknen wurde der Niederschlag zu einem weissen Pulver zerrieben.

Im Gegensatz zum Dextranpulver löste sich diese erste Fraktion des Abbauprozesses in kaltem Wasser ziemlich gut auf. Die Lösung zeigte eine starke kolloidale Trübung, während die FEHLING'sche Reaktion der Lösung sehr schwach positiv war. Nach sorgfältigem Abfiltrieren wurde die übriggebliebene alkoholhaltige Flüssigkeit auf einem Wasserbade zu einem braunen (durch das Vorhandensein von Pepton) viskös-sirupartigen Rückstand eingedampft. Zu diesem Sirup wurde soviel 96% Alkohol gegossen bis der Alkoholgehalt 80% betrug. Unter gutem Umrühren setzte sich eine fadenziehende Substanz ab, welche in aussergewöhnlich starker Weise an den Instrumenten kleben blieb.

Nachdem diese Substanz zur weiteren Reinigung noch zweimal in Wasser aufgelöst und mit Alkohol (80%) präzipitiert war, erhielt ich nach dem Trocknen und Zerreiben ein weisslich-lichtgelbes Pulver, welches sich sehr gut, bei nicht zu hoher Konzentration ohne Trübung, in kaltem Wasser auflöste. Es reduzierte FEHLING'sche Lösung stark und ergab mit Jod keine Färbung. Dass es sich hier um ein Gemisch reduzierender dextrinartiger Stoffe handelte, wird auf Grund der folgenden Beobachtungen wahrscheinlich:



1. Der hohe Wert für die spez. Drehung:  $[\alpha]_D = 170^\circ$ .
2. Das praktisch vollkommene Fehlen von vergärbarem Zucker. Im Vergärungsapparat blieb nach der zweiten Reinigung (Präzipitieren mit Alkohol) die Kohlensäurebildung in einer 5% Lösung in Hefewasser beinahe ganz aus, nur eine ganz kleine Gasblase war sichtbar. Im Kontrollapparat, in dem ausserdem noch 2% Glucose zugefügt worden war, gäerte die Flüssigkeit normal aus. Es waren also keine giftigen Produkte vorhanden. Es war daher höchstens eine geringe Menge vergärbaren Zuckers als Verunreinigung vorhanden. Nach erfolgter Gärung zeigte die Dextrinlösung noch eine merkliche Reduktion der FEHLING'schen Lösung. Ein grosser Teil des Reduktionsvermögens stammt also von unvergärbaren Stoffen her. In einem zum 3ten Mal durch Alkoholpräzipitierung gereinigten Produkt, blieb die Kohlensäurebildung völlig aus.
3. Die Bestimmung des Reduktionsvermögens nach SCHOORL.  
 Von dem Pulver wurden 500 mgr in einem Masskolben von 100 cm<sup>3</sup> in Lösung gebracht. 20 cm<sup>3</sup> dieser Lösung, oder 100 mgr des Pulvers, verursachten eine Reduktion der FEHLING'schen Lösung, welche mit 2,52 cm<sup>3</sup> 0,1 N Thiosulfat übereinstimmte. Eine solche Reduktion korrespondiert mit 7,9 mgr Glucose; es betrug also das Reduktionsvermögen des Präparates nur 7,9% von dem der Glucose.

Ausser dem, als zweite Fraktion bezeichneten Präzipitat, wird natürlich noch eine bestimmte Menge von Abbauprodukten in der alkoholhaltigen Hydrolyseflüssigkeit zurückgeblieben sein. In erster Linie werden es Zucker gewesen sein, wahrscheinlich aber auch reduzierende unvergärbare Stoffe, wie niedere Dextrine.

Ein Präzipitat, welches durch Erhöhen des Alkoholgehaltes über 80% entsteht, habe ich aber nicht auf dextrinartige Stoffe untersucht, da die Untersuchung durch verschiedene ebenfalls niedergeschlagene Peptonbestandteile sehr erschwert wurde.

Hingegen habe ich die in 80% Alkohol lösliche Fraktion auf das Vorhandensein vergärbaren Zucker untersucht. Dass dieser vorhanden sein würde, war daraus zu schliessen, dass sich bereits im unverarbeiteten Hydrolysat eine Vergärung gezeigt hatte. Tatsächlich zeigte sich auch hier im quantitativen Vergärungsapparat eine gehörige Kohlensäurebildung, wenn ich die in 80% Alkohol lösliche Fraktion in Hefewasser mit *Saccharomyces cerevisiae* vergären liess. Können wir nun daraus schliessen, dass aller vergärbare Zucker Glucose ist? So ohne weiteres ist dies sicher nicht der Fall, denn obwohl wir bei der Säurehydrolyse bloss Glucose vorfanden, ist es immerhin denkbar, dass durch die en-

zymatische Hydrolyse auch höhere, aus Glucose aufgebaute Saccharide entstehen. Soweit diese durch *Saccharomyces cerevisiae* vergärbbar sind, wird man wohl ausschliesslich an Maltose zu denken haben<sup>1)</sup>.

Es war darum wichtig zu untersuchen, ob die vergärbaren Zucker vielleicht ganz oder teilweise aus Maltose bestehen. Der einfachste Nachweis bestand in der quantitativen Vergärung und zwar einerseits mit *Saccharomyces cerevisiae*, andererseits mit *Saccharomyces fragrans* BEIJERINCK, einer von mir aus Schiedamer Presshefe gewonnenen und reinkultivierten Hefe, welche Maltose nicht vergärt. Bei beiden Untersuchungen kam praktisch die gleiche Kohlensäurebildung zum Vorschein, sodass also Maltose sicherlich nicht in grosser Menge vorkommen konnte. Hiermit wurde es sehr wahrscheinlich gemacht, dass auch bei der enzymatischen Hydrolyse Glucose gebildet wird.

Zusammenfassend können wir schliessen, dass bei der enzymatischen Hydrolyse des Tibi-Dextrans primär in Wasser lösliche, dextrinartige Verbindungen von abnehmender Komplexität entstehen, welche Verbindungen weiterhin zum Teil zu Glucose hydrolysiert werden.

Schliesslich sei noch darauf hingewiesen, dass *Bacillus palustris* ebenfalls eine kräftige amylolytische Wirkung besitzt. Nach Überimpfung dieses Bakteriums in einen Kolben mit Peptonwasser und 15% Stärke (Kartoffelstärke) war nach einem Tag die dicke kleisterartige Masse dünnflüssig. Eine orientierende Untersuchung der Kulturflüssigkeit nach 3-wöchentlichem Stehen bei 35° C zeigte, dass auch hierin grosse Mengen Dextrin, neben nur geringen Mengen Zucker, vorhanden waren. In dieser Hinsicht besteht also eine grosse Übereinstimmung im Abbau von Dextran und von Stärke mittels *Bacillus palustris*. Dass allerdings diese beiden Abbauprozesse unter dem Einfluss verschiedener hydrolytischer Enzyme stehen, folgt wohl hieraus, dass verschiedene die Stärke gut angreifende Bakterienarten wie: *Aerobacillus polymyxa* und *Zymobacillus macerans* das Dextran überhaupt nicht angreifen.

---

<sup>1)</sup> Ein anderes durch Presshefe, allerdings langsam, vergärbares und aus zwei Glucosebausteinen zusammengesetztes Disaccharid ist die Trehalose. Jedoch kommt dieser nicht-reduzierende Zucker als Baustein eines Polysaccharides nicht in Betracht.

## ZWEITER TEIL.

### DIE DISSOZIATION VON *BETABACTERIUM VERMIFORME*, NEBST EINIGEN ALLGEMEINEN BETRACHTUNGEN ÜBER DAS DISSOZIATIONSPHÄNOMEN.

Zwar hat die Genetheorie für die Mikroben noch keine besondere Wichtigkeit erlangt. Da dieses wohl der Fall ist für die höheren Organismen muss angenommen werden, dass beim weiteren Studium der Mikrobenvariabilität die Fruchtbarkeit dieser Theorie sich ebenfalls herausstellen wird.

M. W. BEIJERINCK.

Belangstelling in genetische vraagstukken is op zich zelve voldoende drijfveer te streven naar een bevredigend inzicht in de verschijnselen van bacterieele veranderlijkheid.

J. J. VAN LOGHEM.





## KAPITEL X.

### KURZE ÜBERSICHT ÜBER DAS PHÄNOMEN UND DAS WESEN DER BAKTERIEN-DISSOZIATION.

#### § 1. EINFÜHRENDE BEMERKUNGEN.

Wie in der Einleitung mitgeteilt wurde, befasst der zweite Teil meiner Arbeit sich mit dem Studium der Dissoziationserscheinung bei *Betabacterium vermiforme*.

Bekanntlich versteht man unter Dissoziation bei Mikroorganismen das Auftreten von Kolonien von verschiedenartigem Typus bei der Züchtung einer Reinkultur auf einem und demselben festen Nährboden, wenigstens für so weit es sich zeigt, dass die beiden Typen sich bei der Weiterzüchtung entweder während kürzerer oder längerer Frist oder möglicherweise auch dauernd behaupten.

In Kapitel III § 2 wurde bereits erwähnt, dass ein solches Phänomen auch beim Züchten des Tibi-Bakteriums auf festen Nährmedien auftritt.

Die Ansicht, dass hier tatsächlich ein Dissoziationsphänomen im Sinne der oben gegebenen Umschreibung vorlag, wurde verstärkt durch die Beobachtung, dass bei den neuen Formen nicht nur das Aussehen der Kolonien verändert war, sondern dass das Bakterium auch in physiologischer Hinsicht eine auffallende Veränderung durchgemacht hatte. Es zeigte sich nämlich, dass die so charakteristische Erscheinung der Wandstoffproduktion aus Saccharose bei den neu aufgetretenen Formen verloren gegangen war.

Eine Fortsetzung dieser Untersuchung lehrte, dass die Dissoziation nicht allein auf die zwei genannten neuen Kolonietypen beschränkt blieb, sondern dass daneben noch verschiedene andere Typen von *Betabacterium vermiforme* auftraten.

Um nun die Befunde meiner Untersuchung in einen passenden Rahmen zu setzen, erscheint es mir in erster Linie nötig in den folgenden Paragraphen eine kurze Übersicht über die meist charakteristischen Erscheinungen zu geben, welche den vielen Untersuchungen über die Dissoziationserscheinung zu entnehmen sind.

Bevor ich darauf eingehe, mögen hier noch einige Bemerkungen allgemeiner Art folgen.

Wie schon aus der oben gegebenen Umschreibung hervorgeht, bildet die Dissoziationserscheinung einen Teil des allgemeinen Problemes der Mikroben-Variabilität. Die diesbezügliche Literatur ist dermassen umfangreich, dass es unmöglich ist, sie in ihrer Gesamtheit zu überblicken.

Nun ist jedenfalls deutlich, dass der allgemeine Begriff „Mikroben-Variabilität“ eine Reihe von Erscheinungen umfasst, welche mehr oder weniger scharf von der Dissoziationserscheinung abzugrenzen sind.

Ohne hier tiefer auf die Systematik und das Wesen der verschiedenen bei Mikroorganismen gefundenen Variationserscheinungen einzugehen, will ich doch kurz einige dieser abweichenden Variationstypen anführen. In der Mikrobiologie begegnet man oftmals einer Erscheinung, die sich dadurch kennzeichnet, dass äussere Bedingungen einen tiefgehenden Einfluss auf die Erscheinungsform und andere Eigenschaften einer Mikrobenart ausüben. Wo es nach Wiederherstellung der ursprünglichen Bedingungen zu einer unmittelbaren Rückkehr der anfänglichen Eigenschaften kommt, besteht aller Anlass diese Erscheinung in Übereinstimmung mit ähnlichen Variationen bei höheren Organismen, als *Modifikationen* zu betrachten.

Ein sehr bekanntes Beispiel bildet die Erscheinung, dass viele Stämme von *Bacterium prodigiosum* beim Züchten bei niederen Temperaturen durch die starke Produktion eines roten Pigmentes gekennzeichnet sind, während sie in der Kultur bei 37° C völlig farblos wachsen. Kultiviert man jedoch Überimpfungen dieser letzten Kulturen bei niederen Temperaturen, dann tritt wieder unmittelbar Pigmentbildung ein. Es bedürft keine nähere Erläuterung, dass diese Erscheinung von der Dissoziationserscheinung grundverschieden ist, da sich ja bei letzterer die Unterschiede zwischen den aufgetretenen Formen gerade bei gleicher Konstellation der äusseren Bedingungen manifestieren.

Eine zweite von der Dissoziation abzugrenzende Variationserscheinung ist die *Adaptation* im engeren Sinne. Hierunter versteht man die Erscheinung, wobei eine Mikrobe sich allmählich an äussere Bedingungen anpasst, welche der ursprünglichen Form keine Vermehrungsmöglichkeit bieten.

Offenbar haben wir es in solchen Fällen mit dem Resultat einer kontinuierlichen Variation und einer gleichzeitig wirkenden künstlichen Selektion durch die äusseren Bedingungen des Milieus zu tun. So kann



man durch besondere Massregeln Bakterien sich z.B. an höhere oder niedrigere Temperaturen gewöhnen lassen oder an bestimmte Mengen von Antiseptika, unter welchen Bedingungen sich die ursprüngliche Form nicht entwickeln kann. Kennzeichnend für eine solche Adaptationserscheinung ist, dass diese nur allmählich d.h. über eine bestimmte Anzahl von Subkulturen zur Entfaltung kommt und vor allem, dass *sämtliche*, resultierende Zellen hinsichtlich der Ausgangsform Veränderungen erlitten haben.

Obwohl in manchen Fällen das Eintreten einer Dissoziation augenscheinlich ebenfalls an äusseren Bedingungen gebunden sein kann, unterscheidet sie sich doch von der soeben beschriebenen Adaptation dadurch, dass die neue Variante plötzlich in einer einzigen Kultur auftritt und vor allem auch durch die Tatsache, dass sich daneben die Ausgangsform behauptet. Auch besteht mit der Adaptation dadurch ein auffallender Unterschied, dass bei der Dissoziation die eingetretenen Veränderungen keinerlei direkten Zusammenhang mit der Art der Veränderungen der äusseren Faktoren aufweisen. Dies kommt deutlich dadurch zum Ausdruck dass auseinandergehende Veränderungen dieser Faktoren öfters den gleichen Effekt erzielen.

Aus dem soeben Gesagten erhellt, dass in der folgenden Übersicht von vornherein zahlreiche Variabilitätserscheinungen ausser Betracht bleiben können.

Bemerkt sei noch, dass in § 2 zuallererst eine Übersicht über die äusseren Erscheinungsformen der Dissoziation gegeben werden soll. Hiernach folgt in § 3 eine kurze Besprechung der Meinungen hinsichtlich der Ursachen, welche der Dissoziation zugrunde liegen. Nach der Beschreibung meiner eigenen Befunde werde ich dann in Kapitel XII darauf noch näher eingehen.

## § 2. KURZE CHARAKTERISTIK VON DER ERSCHEINUNG DER BAKTERIEN-DISSOZIATION.

Im Laufe der Zeit wurde das Dissoziationsphänomen bei sehr vielen Bakterienarten untersucht, sodass sowohl das Tatsachenmaterial und die diesbezügliche Literatur einen ungeheueren Umfang genommen hat.

Ich werde mich hier bloss auf die Beschreibung der Dissoziationserscheinung in ihren allgemeinen und für die Mehrzahl der untersuchten Bakterienarten charakteristischen Zügen beschränken. Für eine voll-

ständigere und mit vielen Beispielen dokumentierte Übersicht verweise ich auf: ARKWRIGHT (1930) und auf die drei Zusammenfassungen von HADLEY (1927, 1931, 1937).

Wie bereits in § 1 mitgeteilt wurde, versteht man unter *Dissoziation* eine Eigenschaftsvariation bei Bakterien, die sich beim Züchten auf festen Nährböden im Auftreten von untereinander verschiedenen Kolonien äussert. Die aufgetretenen Varianten vermögen sich, meistens selbst auf abgeänderten Nährmedien und unter verschiedenen Kulturbedingungen, zu behaupten.

Für die Dissoziation kennzeichnend ist die Erscheinung, dass die Varianten und die ursprüngliche Form nebeneinander gezüchtet werden können, wobei jede für sich ihre charakteristischen Eigenschaften beibehält.

Die Veränderungen in das Aussehen und die Form der Kolonie bezieht sich fast immer auch auf die Morphologie (Form und Abmessungen) der einzelnen Zellen.

Die physiologischen Veränderungen können als Abänderungen in der Virulenz und im serologischen Verhalten, in fermentativen Eigenschaften (Säure- und Gasbildung aus Zuckerarten), in der Produktion von Schleim oder Pigment, in der Beweglichkeit u.s.w. auftreten.

Bereits in der Anfangsperiode der Bakteriologie fiel die Variation in Kolonie- und Zellform auf, jedoch betrachtete man sie meistens als teratologische Erscheinungen und infolge der Fülle der Probleme, welche das Studium der normalen Bakterienformen bot, ist man lange Zeit an dieses Problem vorbeigegangen.

Zu den ersten, die mehr bewusst diese Variationen studierten, gehören: NEISSER (1906) und MASSINI (1907). Sie stellten fest, dass beim Züchten eines Stammes von *Bacillus coli mutabile* auf ENDO-Platten oft in den farblosen Kolonien auf die Dauer rote Papillen auftraten. Diese rote Verfärbung war die Folge des plötzlich auftretenden Vermögens dieses Bakteriums um Lactose vergären zu können. Eine nähere Untersuchung lehrte, dass bei Weiterzüchtung dieser roten Papillen ausschliesslich rote Kolonien zur Entwicklung kamen, während Weiterzüchtung vom weissen Kolonietypus neben dieser Form immer wieder rote Papillen entstehen liessen.

Im Jahre 1912 gab BEIJERINCK einen wichtigen Beitrag zur Kenntnis dieser Art von Variationserscheinungen heraus. Von einigen Bakterienarten, u.a. *Bacillus prodigiosus*, *Bac. herbicola*, *Bac. indicus*, und einer Hefe, *Schizosaccharomyces octosporus*, wurden Variationserscheinungen beschrie-



ben, welche heute als Äusserungen der Dissoziation bezeichnet werden können.

Besonders wurden in dieser Abhandlung eine Menge Varianten von *Bacillus prodigiosus* beschrieben, welche in physiologischer Hinsicht (Pigment und Schleimproduktion) von der Ausgangsform abwichen. Diese mehr oder weniger konstanten Variationen zeigten sich meistens verknüpft mit Abänderungen in der Morphologie der Kolonien und Zellen.

Im Jahre 1918 hat BAERTHLEIN bei verschiedenen Bakterienarten, wie Typhus-, Paratyphus- und Coli-Bakterien, FRIEDLÄNDER's Bazillus u.a. die Erscheinung der Variation ausführlich untersucht.

Er beobachtete, dass die Variation der Kolonieform zusammengehen kann mit einer Abänderung entweder in der Morphologie der Zellen, oder in den fermentativen und serologischen Eigenschaften, in der Virulenz oder endlich in der Pigmentbildung.

Die Untersuchungen von DE KRUIF und ARKWRIGHT im Jahre 1921 bildeten den Ausgangspunkt eines Stromes von Veröffentlichungen, welche sich mit dem Variabilitätsphänomen befassen. Der erstgenannte Autor führte die Bezeichnung „Dissoziation“ ein für die von ihm festgestellte Erscheinung, dass bei der Züchtung von *Bacillus lepi-septicus* zweierlei Kolonietypen entstanden, welche er als diffus und granular unterschied. Als wichtigster Gesichtspunkt trat die Entdeckung hervor, dass bei allen Bakterienarten, bei denen man die Dissoziation näher studierte, zwei deutlich äusserlich voneinander zu unterscheidende Kolonievvarianten aufzutreten pflegen.

ARKWRIGHT hat für diese beiden Kolonietypen die Bezeichnung S(smooth) und R(rough) eingeführt. Diese Terminologie bezieht sich lediglich auf das Aussehen der Kolonie. Der S-Kolonietypus ist meist rund mit unverletztem Rand, während seine Oberfläche glatt und glänzend ist. Dagegen ist der R-Typus meist etwas grösser und platter, an seiner Oberfläche mehr oder weniger rau, während der Rand unregelmässig gewellt oder eingeschnitten erscheint. Neben den Unterschieden in der Kolonieform zeichnen sich die S- und R-Varianten in der Mehrzahl der Fälle auch in Unterschieden der Zellmorphologie aus. Meistens besitzt der R-Typus längere Zellen, welche nicht selten zu langen, unsegmentierten Drähten oder zu langen, aus einzelnen Zellen zusammengesetzten, Ketten ausgewachsen sind (HADLEY 1937). In vielen Fällen ist auch die Art des Wachstums in flüssigen Medien verschieden; so verursacht z.B. bei der Colon-Typhus-Dysenteriegruppe der S-Typus im Anfang eine einheitliche Trübung des Mediums, während R ein



granulares Wachstum zeigt, welches an eine spontane Agglutination denken lässt.

Als eine sehr häufig auftretende Erscheinung können wir feststellen, dass eine Bakterienart, welche nach der Isolierung anfangs ausschliesslich S-Kolonietypen hervorbringt, beim Weiterzüchten auf festen Nährmedien oder nach dem Abstreichen aus Flüssigkeitskulturen auf Platten, auch R-Kolonietypen zur Entwicklung bringt. Manchmal vollzieht sich der Übergang von S  $\rightarrow$  R via eine oder mehrere Zwischenformen.

Eine Reversion von R  $\rightarrow$  S, welche stets sprunghaft zu geschehen scheint, kommt oft vor, obwohl sie meistens weniger leicht und weniger frequent als der Übergang von S  $\rightarrow$  R auftritt.

Die genannten Formen sind nun von vielen Bakterienarten ausführlich beschrieben worden. Als Beispiele nenne ich bloss: *Bacterium coli communis*, *Bac. subtilis*, sowie die pathogenen Arten: *Mycobact. tuberculosis*, *Corynebact. diphtheriae*, *Bac. anthracis*, *Salmonella aertrycke*, *Shigella paradysenteriae* usw.

Vor kurzem hat HADLEY den Standpunkt vertreten, dass man im Dissoziationsmuster im allgemeinen auch noch das Vorkommen eines M(mukoid)-Typus neben den S- und R-Typen erwarten kann. Ein derartiger Typus wurde in 1934 von DAWSON bei *Pneumococcus* aufgefunden. HADLEY weist darauf hin, dass für die Frequenz, mit der die Typen S, R, und M im Dissoziationsmuster auftreten, bei der Mehrzahl der Bakterienarten die Folge: S  $\succ$  R  $\succ$  M festzustellen ist. Der M-Typus scheint durchwegs aus der S-Form hervorzugehen und von ihr mit Ausnahme der Konsistenz der Kolonie nur wenig zu differieren. Auch in zellmorphologischer Hinsicht scheint oftmals M mit S ungefähr gleichwertig zu sein; die M-Zellen sind jedoch gekennzeichnet entweder durch den Besitz einer Kapsel, oder sie sind nackt, aber dann in einer dünnschleimigen Substanz eingebettet.

Gleich dem Übergang S  $\rightarrow$  R sind auch bei M  $\rightarrow$  S zuweilen Zwischenformen vorhanden, z.B. bei Typus I *Pneumococcus* (BLAKE und TRASK, 1933). Allerdings scheint es auch vorzukommen, dass mukoiden Kolonietypen einen R-Charakter haben; in diesem Fall handelt es sich um Kolonien, welche aus dem R-Typus entstanden sind und in zellmorphologischer Hinsicht ihm entsprechen. Die Zellen sind aber gekapselt oder produzieren einen dünnen Schleim. Ein Beispiel eines mukoiden R-Typus zeigt sich bei *Serratia marcescens* (REED, 1937). Bei verschiedenen Bakterienarten ist dieser M-Kolonietypus im Dissoziationsmuster deutlich zu erkennen, z.B. bei *Pneumococcus* (DAWSON, 1933),

*Clostridium Welchii* (STEVENS, 1935), *Bact. granulosis* (HARRISON, 1936), *Escherichia coli* (TORREY und MONTU, 1936), *Micrococcus tetragenus* (REIMANN, 1937). In einer Reihe von Veröffentlichungen findet man noch einen weniger oft vorkommenden Kolonietypus, n.l. die G- oder Zwergkolonie, die durch ihre geringe Abmessung gekennzeichnet ist, erwähnt. Die G-Kolonien scheinen, ebenso wie die M-Typen meistens, aus S-Formen zu entstehen, in diesem Fall haben sie eine glatte Oberfläche. Die Zellen können nahezu denen der S-Form entsprechen, u.a. bei *Staphylococcus aureus* (SWINGLE, 1935), *Shigella dysenteriae* (KOSER und DIENST, 1934).

Auch zwischen S- und G-Formen können Übergangsformen vorkommen z.B. bei *Shigella dysenteriae* (KOSER und DIENST, 1934). Ein einziges Mal ist bei *Shigella* konstatiert, dass eine G-Kolonie aus dem R-Typus entstand; die Oberfläche dieser Zwergkolonie war rau und hatte einen unregelmässigen Rand (HADLEY, 1931). Der Zwergcharakter der G-Kolonieform ist weniger die Folge kleinerer Zellen, als wohl einer verzögerten Vermehrung dieser (herabgesetzter Vitalität). Bei einzelnen Bakterienarten sind im Dissoziationsmuster noch Kolonietypen unterzubringen, welche von den oben beschriebenen Formen mehr oder weniger abweichen, z.B. der „matte“ Kolonietypus bei den hämolytischen Streptokokken.

Wie bereits erwähnt wurde, ist bei der Dissoziation eine Veränderung in der Kolonie- und Zellform meistens verknüpft mit Abänderungen in physiologischer Hinsicht.

Da sich die Literatur über die Dissoziationserscheinung grösstenteils auf die Gruppe der pathogenen Mikroben bezieht, werden als auffällige physiologische Variationen vielfach Abänderungen der Virulenz und des serologischen Verhaltens beschrieben. Bei den pathogenen Arten entspricht die am meisten virulente Form häufig der S-Form, so z.B. bei *Eberthella*, *Salmonella*, *Corynebact. diphtheriae*. In diesem Fall wird beim Übergang von S  $\rightarrow$  R oder S  $\rightarrow$  M die Virulenz sehr oft stark herabgesetzt, auch kann sie ganz verschwinden; ausserdem verändert sich hierbei das serologische Verhalten. Tritt ein Rückschlag von R  $\rightarrow$  S oder M  $\rightarrow$  S auf, dann kehren die Virulenz und die ursprünglichen serologischen Eigenschaften meistens völlig zurück.

Auch bestehen Arten, bei denen gerade der M-Typus mit seinen gekapselten Individuen die virulente Form darstellt. Dies gilt z.B. für die *Pneumococcus*-Typen und für *Pneumobacillus*; bei ihnen sind die S- und R-Typen avirulent. Die Virulenz und die typus-spezifischen antigenen Eigenschaften zeigen sich für die letztgenannten Bakterienarten



streng an den Besitz einer Kapsel gebunden. Einen Fall, bei dem der R-Typus als die eigentliche, stark virulente Form auftritt, finden wir bei *Bacillus anthracis*. Auch kann eine bestimmte Veränderung in der Kolonief orm mit einer biochemischen Abweichung verknüpft sein. Beispiele hiervon sind die nicht-Vergärung bestimmter Zuckerarten (von Lactose durch eine Variante von *Bacillus coli*, die nicht-Vergärung von Mannit durch Varianten von *Shigella dysenteriae*), das Ausbleiben einer Gasbildung aus Glucose (gaslose Varianten von Paratyphus-Stämmen, TASMANN und POT, 1934), das Unterbleiben der Pigmentbildung (albus-Variante von *Bacillus prodigiosus*, BEIJERINCK, 1912), Verlust der Beweglichkeit bei *Bacillus proteus* (FELIX und OLITZKI, 1928), das Auftreten von Schleimproduktion (bei der bereits genannten M-Kolonievariante).

Obwohl es anfänglich schien, als ob immer ein unzertrennlicher Zusammenhang zwischen morphologischen und physiologischen Veränderungen bestehe, zeigt sich doch, besonders in der Literatur der letzten Zeit, dass auf diese allgemeine Regel eine nicht unbeträchtliche Zahl von Ausnahmen vorzufinden sind. Einige Beispiele mögen dies veranschaulichen.

1. Virulenzveränderungen, welche nicht mit einer Transformation der Kolonie verknüpft sind, z.B. bei *Bac. anthracis* (NUNGESTER, 1933), *Corynebact. diphtheriae* (JONES, 1933).

2. Beweglichkeit und Unbeweglichkeit, welche beide bei S- als auch bei R-Typen vorkommen, z.B. bei der Schweinscholera (LI, 1929).

3. Keine Korrelation zwischen der Koloniestruktur und der Gasbildung aus Glucose, z.B. bei *Bac. paratyphosus* B (NUNGESTER, 1933), der Koloniestruktur und serologischen Eigenschaften bei *Bac. dysenteriae* (WAALER, 1935).

4. Unabhängige Variation aller Merkmale bei *Bac. megatherium* (KNAYSI, 1933).

5. Differenzierung in verschiedenen Farben, wobei jede Farbe ihre eigene Koloniereihe S, R, M, besitzt, wie z.B. bei *Micrococcus tetragenus* und *Serratia marcescens* (REIMANN, 1937; REED, 1937).

6. Beim langen Aufbewahren von *Bact. coli* und coli-artigen Stämmen zeigte sich, dass:

a. einige Stämme sich im Gärungsvermögen geändert hatten, wobei jedoch alle beim Aussäen nur eine Kolonief orm bildeten.

b. Stämme beim Aussäen verschiedene Kolonietypen zum Vorschein brachten, ohne dass eine Veränderung der fermentativen Eigenschaften eingetreten war.



c. Stämme beim Aussäen sowohl hinsichtlich der Kolonieforn als auch in fermentativer Hinsicht neue Varianten abspalteten (NYBERG, BONSDORFF und KAUPPI, 1937).

7. Es zeigte sich keine konstante Korrelation zwischen der Kolonieforn und der antigenen Struktur bei *Salmonella pullorum* (ROEKEL und RETTGER, 1936).

Hinsichtlich der Faktoren, welche das Dissoziationsphänomen bestimmen, sei bemerkt, dass dieses in vielen Fällen anscheinend „spontan“ eintritt; die Varianten erscheinen dann ohne sichtbare Ursache auf den für die betreffenden Bakterien gebräuchlichen Nährböden. Wenn bei Weiterzüchtung auf den normalen, gebräuchlichen Nährböden die Dissoziation nur ausnahmsweise oder überhaupt nicht „spontan“ eintritt, dann kann man diese in vielen Fällen induzieren, indem man die Zusammensetzung der Nährböden oder die Kulturbedingungen ändert. Auch die Vorkultur der auf den festen Nährböden zu impfenden Zellen scheint meistens von ausschlaggebender Bedeutung zu sein. Als Methoden, welche oft zum Ziele führen, kennt man u.a. das Altern von Agar- oder Bouillon-Kulturen, die Züchtung auf alkalischen Nährböden oder in alkalischer Bouillon, die Züchtung auf Nährböden oder in Bouillon, in welchen kleine Mengen bestimmter Chemikalien, wie Phenol oder Lithiumchlorid, hinzugefügt sind, die Züchtung bei niederer oder höherer Temperatur, die Züchtung in Bouillon mit homologem Antiserum, Bakteriophagenwirkung, Tierpassage usw. Die Kultur in spezifischem Immunsorum oder die Einwirkung des Bakteriophagen zeigen sich wohl als die zweckmässigsten Mittel zur Erhaltung von Varianten.

Aus der vorhergehenden Aufzählung erhellt, dass beim Auftreten der Dissoziation den äusseren Bedingungen eine wichtige Rolle zukommt.

Wie wir in Kapitel XII näher auseinandersetzen werden, wirken die äusseren Bedingungen, induzierend, d.h. auslösend auf die Dissoziation.

Als allgemeine Erscheinung ist noch zu erwähnen das Auftreten von Stabilitätsunterschieden eines und desselben Variantentypus, z.B. S oder R, bei verschiedenen Stämmen einer und derselben Bakterienart. Je nach der Stabilität von morphologischen, bzw. physiologischen Merkmalen bei den verschiedenen Stämmen von S-, R-, M-Varianten können die folgenden Möglichkeiten eintreffen:

1. Formen, welche entweder spontan oder durch Induktion aufgetreten, während der ganzen Untersuchung vollkommen konstant bleiben; gleichgültig auf welchen Nährböden man züchtet und unter welchen Bedingungen, zeigt sich die eingetretene Veränderung „irreversibel“.

Man könnte hier von „stabilen“ Formen sprechen. Eine solche vollkommene Stabilität scheint jedoch höchst selten oder möglich gar nicht vorzukommen. Nicht selten finden sich in der Literatur Angaben, dass Variantenstämme viele Monate hindurch, selbst Jahre lang, in Reinkultur gehalten, konstant bleiben; die Tatsache, dass diese Kulturen sehr oft unter dem Einfluss bestimmter stark induzierender Agenzien dennoch dissoziieren, zwingt zu grosser Vorsicht in der Schlussfolgerung hinsichtlich vollständiger Stabilität eines bestimmten Stammes. In der hier gegebenen, sehr groben Einteilung will ich zu den „stabilen“ Formen auch diejenigen Variantenstämme rechnen, welche der Dissoziation hartnäckigen und auffällig langen Widerstand leisten, dermassen, dass sie während den angestellten Untersuchungen völlig oder doch in beträchtlichem Masse konstant sind.

Als Beispiel verweise ich auf die Untersuchung von MALLMANN (1932) u.a. über *Salmonella pullorum*; er experimentierte mit verschiedenen R- und S-Stämmen, von denen mehrere für die angewandten Induktionsmethoden unempfindlich waren und eine ausgesprochene Stabilität zeigten.

Ein anderes Beispiel bilden die von KUN und VON FENYVESSY (1932) beschriebenen extrem-rauhen Stämme des Influenzabacillus, welche selbst nach einigen Jahren noch vollkommen konstant geblieben waren.

Weiterhin wurden von SWINGLE (1935) bei *Staphylococcus aureus* G-Stämme isoliert, welche verschiedene Grade an Stabilität besaßen; unter diesen wurden auch solche Stämme vorgefunden, welche sich stabil und irreversibel zeigten.

2. Formen, welche bei Weiterzüchtung auf normalen, gebräuchlichen Nährböden in ziemlichem Masse konstant bleiben und auf diese Weise überhaupt nicht oder nur infrequent dissoziieren. Wendet man eine oder mehrere der obengenannten Induktionsmethoden an (z.B. wiederholtes und schnelles Überimpfen in Bouillon, Altern von Bouillonkulturen, Züchtung in homologem Antiserum oder Bakteriophagenwirkung), dann gelingt es ziemlich leicht auf kurzer Frist das Auftreten neuer Varianten auszulösen oder zu stimulieren. Diese Formen, welche also unter den normalen, d.h. gebräuchlichen Kulturbedingungen ziemlich konstant sind, könnte man „relativ stabil“ nennen.

Zuweilen findet man, dass eine Reversion nicht ganz in die ursprüngliche Ausgangsform resultiert; es bleiben noch kleinere oder grössere Unterschiede mit der Ausgangsform vorhanden. Man kann dann wohl von „partieller“ Reversion sprechen. Im Zusammenhang hiermit verweise



ich auch auf die oft in der Literatur vorkommende Bezeichnung „roughness“ in verschiedenem Grade.

3. Eine dritte Gruppe besteht aus Formen, welche bei Züchtung auf normalen, gebräuchlichen Nährböden, und vor allem bei einigermaßen altern lassen solcher Kulturen, leicht und frequent dissoziieren. Zu ihnen gehören sowohl als S, R, M (und G?) zu bezeichnenden Typen, als auch ausgesprochen intermediäre Formen. Man könnte hier am besten sprechen von „labilen“ Formen.

Das Auftreten der Dissoziation kann hier auf die folgende Weise zum Ausdruck kommen. Bereits in der Kolonie der „labilen“ Ausgangsform kann sich das Auftreten eines neuen Typus makroskopisch manifestieren durch Bildung entweder von sekundären Kolonien, oder von Papillen, von Sektoren oder marginalen Auswüchsen („outcroppings“). Derartige Auswüchse können so stark hervortreten, dass die ursprüngliche Kolonie (z.B. eine R- oder S-Kolonie) gänzlich von einer gleich-breiten Randzone, zusammengesetzt nur aus Zellen der neuen Variante, umgeben ist. Es ist dann die Rede von einer konzentrischen „Mischkolonie“. Als solche kennt man u.a. SR, RS und SM-Mischkolonien, z.B. bei *Clostridium Welchii* (STEVENS, 1935), *Bacillus coli communis* (DULANEY, 1928). Beim Abstreichen einer Suspension des Zentrums einer SR-Kolonie z.B. erhält man durchwegs Mischplatten mit S- bzw. SR-Kolonien. Streicht man aber eine Suspension von Zellen aus der Randzone ab, dann ergibt die Kultur ausschliesslich R-Kolonien. Der neue Typus kann allerdings bereits in der labilen Ausgangsform vorhandensein, ohne dass es an dem Aussehen der Kolonie erkennbar ist. Streicht man Suspensionen solcher Kolonien auf Platten ab, dann erhält man doch Platten, welche ganz bestimmt ein Gemisch von Kolonien des ursprünglichen und des neuen Typus zur Entwicklung bringen (DESKOWITZ, 1937).

DESKOWITZ zeigte, dass sich die Labilität auf fast jede Kolonieform erstrecken kann. Bei *Salmonella aertrycke* isolierte er u.a. einen „unstabilen“ R-Typus, welcher bei Weiterzüchtung fortwährend und in konstantem Verhältnis eine stabile S-Form abspaltete. Daneben erwähnt er eine kleine instabile R-Kolonie, welche fortwährend einen grossen, stabilen R-Typus abspaltete.

Auch isolierte er noch einen instabilen M-Typus. Labile Varianten wurden überdies u.a. bei *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, FRIEDLÄNDER'S Bazillus, *Bacillus aerogenes* (FECHNER, 1936) vorgefunden.

Mit Hinsicht auf das oben Angeführte, wird es nicht wundern, dass man beim Studium des Dissoziationsphänomens oft für den gleichen



Variantentypus verschiedene Stabilitätsgrade wahrgenommen hat. Es sei allerdings darauf hingewiesen, dass die Frequenz, mit welcher durch Dissoziation neue Varianten auftreten, nicht sonderlich gross ist, selbst nicht, wenn man das Verhalten der sog. „unstabilen“ Formen mit einbezieht. Man vergesse nicht, dass es sich bei einer Bakterienkultur handelt um einen Klon, welcher in kurzer Zeit eine grosse Zahl von Individuen erzeugt. Prozentuell ist die Anzahl Zellen, welche dissoziieren gewiss nicht gross. Die totale, in einer Kolonie vorhandene Anzahl von Variantenzellen kann niemals als brauchbarer Massstab für die Frequenz des eigentlichen Variationsprozesses dienen, da sich während der Entwicklung der Kolonien auch die durch Dissoziation entstandenen Variantenzellen vermehren.

Schliesslich kann noch bemerkt werden, dass an und für sich konstante Typen einer Bakterienart bei Kultur unter speziellen Bedingungen Kolonien aufliefern können, welche in ihrem Aussehen denjenigen der Dissoziationsvarianten gleich sind. Züchtet man jedoch weiter unter den anfänglichen Bedingungen, dann entpuppen sie sich als „pseudo“-Varianten, in so weit, dass dann nur der ursprüngliche Typus wieder auftritt.

Als Beispiel sei hier die Untersuchung PAUL's (1927) erwähnt. Diesem Forscher fiel es auf, dass bei der Züchtung von konstanten S-Stämmen von *Pneumococcus* auf extrem alkalischen Platten und auch bei konzentrierter Aussaat, sich Kolonien oder Kolonieaggregate zeigten mit einer rauhen Oberfläche.

Diese „roughness“ war jedoch keinen Indikator für die Anwesenheit einer R-Variante. Weiterzüchtung dieses rau aussehenden Materials ergab nämlich wieder sogleich Kulturen, welche nur aus typischen S-Kolonien bestanden. Auf Grund dieses Ergebnis kommt PAUL zum Schluss, dass unter bestimmten Umständen „pseudo-rough“-Kolonien auf den Platten erscheinen. Es gibt mehrere Fälle, in denen ähnliche Beobachtungen gemacht worden sind.

MALLMANN (1932) z.B. beobachtete „smoothness“ bei der Züchtung stabiler R-Typen von *Salmonella pullorum* auf Fleischbouillonagar. Wurden diese S-Formen auf dem Normalmedium (Leberinfusionsagar) kultiviert, so nehmen die Kolonien sämtlich wieder den R-Gestalt an.

„Roughness“, d.h. „slightly rough“-Kolonien, zeigte sich bei den stabilen S-Typen auf Leberinfusionsagar. Beim Abstreichen aus der Suspension dieser Kolonien auf Fleischbouillonagar kamen sogleich wieder sämtlich normale S-Kolonien zur Entwicklung. Es braucht keine

nähere Erläuterung, dass derartige Fälle zu betrachten sind als einfache Modifikationen, welche dadurch gekennzeichnet sind, dass die aus der Modifikation resultierenden Formen äusserliche Übereinstimmung mit bestimmten Dissoziationsvarianten aufweisen.

Auch hinsichtlich physiologischer Eigenschaften kann Dissoziation vorgetäuscht werden.

KNAYSI (1933) hat bei seiner Untersuchung bezüglich der Dissoziation von *Bac. megatherium* eine gelb pigmentierte Variante, welche in Form eines gelben Koloniesektors auftrat und sich bei Weiterzüchtung konstant erwies, isolieren können. Ausserdem stellte er auch die Bildung des gelben Pigments bei sekundären Kolonien oder in der peripheren Zone der Mutterkolonie fest.

Im letzteren Fall aber zeigten sich bei Weiterzüchtung des gelben Bakterienmaterials auf den Platten nur farblose Kolonien. Im Gegensatz zu der Pigmentierung der echten gelben Variante ist in diesen Fällen die Pigmentbildung als eine Modifikation in physiologischer Hinsicht zu betrachten.

Nachdem hiermit in grossen Zügen die charakteristischen Erscheinungen der Dissoziation angeführt worden sind, sei im nächsten Paragraph eine kritische Betrachtung der bisher geäusserten Meinungen über das Wesen der Dissoziation gegeben.

### § 3. BESPRECHUNG DER VERSCHIEDENEN ANSICHTEN ÜBER DAS WESEN DES DISSOZIATIONSPHÄNOMENS.

Obwohl das Auftreten von Veränderungen bei Bakterien bereits von vielen ältern Forschern beobachtet wurde, scheint mir eine Beschränkung der Besprechung auf jene Betrachtungen, welche veröffentlicht wurden seit man über die Variabilität bei höheren Organismen eine tiefere Einsicht erhielt, angezeigt. In dieser Hinsicht kann die durch HUGO DE VRIES in 1900 aufgestellte Mutationstheorie als ausschlaggebend gelten.

Es ist sicherlich interessant an dieser Stelle darauf hinzuweisen, dass bereits ein Monat nachdem DE VRIES zum ersten Mal in einem Vortrag vor der „Koninklijke Akademie van Wetenschappen in Amsterdam“ die Grundzüge seiner Theorie auseinandersetzte, BEIJERINCK an der gleichen Stelle seine Untersuchungen über verschiedene Formen erblicher Variation bei Mikroben zum Vortrag bracht (1901).

BEIJERINCK unterscheidet die von ihm untersuchte und bei verschiedensten Organismen beobachtete Variabilität in drei Typen, welche er



Degeneration, Transformation und gewöhnliche Variation nennt. Mit dieser letzten Bezeichnung belegt BEIJERINCK alle jene Veränderungen, welche dadurch gekennzeichnet sind, dass sich der ursprüngliche Mikrobentypus behauptet, während gleichzeitig daneben ab und zu Zellen mit abweichenden Eigenschaften abgespalten werden, welche sich kürzere oder längere Zeit unter Beibehalten der neuen Eigenschaften vermehren.

Die heutzutage als Dissoziation bezeichneten Erscheinungen gehören daher zu dieser Kategorie.

Obwohl BEIJERINCK in seiner Abhandlung nebenbei bemerkt, dass die unter diesen Bedingungen aufgetretenen Varianten wahrscheinlich mit den von DE VRIES bezeichneten Mutanten gleich zu stellen sind, hat er sich damals doch nur wenig der de VRIES'schen Theorie angepasst.

BEIJERINCK betont, dass äussere Faktoren, wie fortgesetztes Züchten unter ungünstigen Bedingungen die primäre Ursache der Veränderlichkeit sein soll. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass sich BEIJERINCK erst infolge einer Diskussion mit de VRIES anlässlich seines Vortrages zu einer Fussnote entschloss, in welcher er die von ihm erwähnten Varianten mit den Mutanten von de VRIES gleichstellte. Allerdings fügt er sogleich hinzu, dass in der mutativen Auffassung der Veränderlichkeit insofern eine Schwierigkeit liegt, als durch sie nicht die oft unverkennbar vorhandene Adaptation zu erklären ist.

Während BEIJERINCK sich also im Jahr 1900 nur zögernd der Mutationstheorie zur Erklärung bakterieller Veränderlichkeit anschliesst, fand diese Theorie bei NEISSER (1906) und MASSINI (1907) grossen Beifall.

Diese Forscher scheuen sich nicht ihre in § 2 kurz erwähnten Untersuchungen über die Veränderungen bei *Bact. coli mutabile* auf dieser Basis zu erklären.

Im Jahr 1912 erschien von BEIJERINCK eine ausführliche zweite Abhandlung, in welcher er sich als überzeugter Anhänger der Mutationstheorie erklärt. Er beschreibt in dieser Veröffentlichung u.a., dass er von *Bac. prodigiosus* 14 verschiedene Varianten (*albus*, *roseus*, *viscosus*, *hyalinus*, usw.) zu isolieren vermochte. Unter diesen befanden sich farblose, schleimbildende Formen und zahlreiche Farbenabstufungen zwischen rot und weiss.

Bei *Schizosaccharomyces octosporus* traten z.B. folgende Varianten auf: *oligosporus* und *asporus*, bei *Bac. herbicola* die Varianten: *flavus* und *ascococcus*. Es zeigte sich, dass diese Varianten in manchen Fällen wieder neue Varianten abspalten konnten. Ausserdem stellte er fest, dass nicht selten auch ein Rückschlag (Atavismus) einer Variante zu der Ausgangs-



form eintrat. BEIJERINCK war völlig überzeugt, dass die obengenannten Variationen als Mutationen aufgefasst werden müssten. Nach ihm sind sie vollkommen den mehr oder weniger konstanten Knospenmutanten der höheren Pflanzen analog. Auch vergleicht er die Mikrobenmutanten mit den Formen der Heterostylen und den beiden Geschlechtern der Diözisten. Schliesslich geht er so weit auch die gewöhnlich als Differenzierung gedeutete Organbildung der höheren Organismen in seine vergleichende Betrachtungen zu beziehen. Die Reize, welche der Mikrobenmutation zugrunde liegen, sind nach ihm denjenigen der „organbildenden“ Mutation ähnlich.

Da BEIJERINCK bei der Auseinandersetzung über die Analogie zwischen Mikrobenvariation und Mutation bei höheren Pflanzen ausschliesslich an Genmutationen denkt, weist er mit Recht darauf hin, dass trotz des Fehlens geschlechtlicher Fortpflanzung bei Bakterien doch kein genügender Grund vorliegt um anzunehmen, dass die Mutanten von Organismen mit Amphimixis in irgendeiner prinzipiellen Beziehung verschieden sein sollten von den Mutanten der Asexuellen. Er stellt sich auf den Standpunkt, dass sowohl beim Auftreten einer Variante als auch beim Zurückschlagen zum Ausgangstypus Progene (Gene in schlummerndem Zustand) in aktive Gene und umgekehrt Gene in Progene übergehen können.

Weiterhin nimmt BEIJERINCK für alle unabhängigen, erblichen Eigenschaften in der Bakterienzelle gesonderte Gene oder Gengruppen an. So z.B. für die Farbe, das Gärungsvermögen, die Schleimproduktion, usw. bei *Bac. prodigiosus*.

Kurz nach BEIJERINCK's Abhandlung erschien auch von EISENBERG (1912) eine Studie über die bakterielle Variabilität. Auch dieser Forscher weist auf die vielen übereinstimmenden Punkte, welche zwischen den in Bakterienkulturen auftretenden Veränderungen und dem als Mutation gedeuteten Entstehen neuer *Oenothera*-Arten bestehen. Auf der anderen Seite weist EISENBERG auf die Möglichkeit, dass die bei Bakterien gefundenen Variabilitäterscheinungen mit jenen auf einer Linie stehen, welche sich bei den „beständig umschlagenden Varietäten“ („eversporting varieties“) bestimmter höheren Pflanzen zeigen. Über die Art der letztgenannten Abänderungen tastete man zu jener Zeit noch nahezu ganz im Dunkeln.

Im Jahr 1921 veröffentlichte VAN LOGHEM eine wichtige theoretische Betrachtung. Diesem Autor gebührt der Verdienst, als erster den Nachdruck auf den Umstand gelegt zu haben, dass die Terminologie der

Genetik, wie diese sich auf Grund der Erscheinungen bei höheren Organismen entwickelt hat, nur mit grossem Vorbehalt auf das Studium der Bakterienvariabilität anzuwenden sei. Zunächst weist er darauf hin, dass — im Gegensatz zu dem, was bei höheren Organismen mit geschlechtlicher Fortpflanzung gilt — der Begriff „Individuum“ sich bei den Bakterien notwendigerweise von der Einzelzelle bis zu sämtlichen, durch fortwährende Teilung daraus entstandenen Zellen, d.h. zu dem „bakteriellen Klon“, erstrecken muss. Von diesem Standpunkt aus gesehen sind also Veränderungen, welche man im Klon auftreten sieht mit Veränderungen vergleichbar, welche man im individuellen Leben der Mehrzelligen antrifft.

Diese Veränderungen gehören also zu jener Kategorie von Erscheinungen, welche man beim mehrzelligen Organismus einfach als physiologische oder pathologische Ereignisse betrachtet.

VAN LOGHEM spricht sich deshalb zu Gunsten der Ansicht aus, dass die bei Bakterien aufgefundenen Veränderungen alle als Abänderungen während des individuellen Lebens betrachtet werden können und daher als solche nicht mehr der Genetik zugehören.

In einer Reihe späterer Veröffentlichungen hat VAN LOGHEM (1931, 1937) seine Ansichten weiter entwickelt. Das Resultat seiner Betrachtungen lässt sich am besten durch das Schema wiedergeben, in welches er in seiner sehr rezenten Arbeit die von ihm anerkannten Typen bakterieller Variabilität zusammenfasst.

I. *Mutationen*: Veränderungen der genotypischen Konstitution.

II. *Physiologische und pathologische Veränderungen*, während des individuellen Lebens eines wachsenden Klons.

*Adaptative Veränderungen*, als physiologische Reaktionen des Bakterienindividuums auf normale Reize aus der Umwelt. Sie äussern sich in Veränderungen der Form, biochemischen Eigenschaften, Virulenz, antigenen Struktur: *Adaptat*.

Der Phänotypus eines Bakteriums ist die Totalität seiner Adaptate. Ein Adaptationszustand kann lange Zeit beständig bleiben (Fixation):

*Fixat*.

*Regressive Veränderungen*, von dauernder Art, als pathologische Reaktion auf schädliche Reize aus der Umwelt.

Atrophie, dauernde Verminderung oder Verlust von Funktion:

*Atropheont*.

Bleibende Beschädigung der Form:

*(Mutilat)*.

Degeneration, pathologische (neue) Funktion:

*Degenerant*.



Zur richtigen Beurteilung dieses Schemas müssen wir hinzufügen, dass nach der Meinung VAN LOGHEM's die täglich wahrnehmbaren Veränderungen alle zur Gruppe II gehören, also funktionelle Äusserungen sind, d.h. Reaktionen des Klons infolge ihrer speziellen physiologischen Eigenschaften. Unter den hierzu gehörigen Variationstypen sollte der adaptative am meisten vorkommen.

Es ist ausser Zweifel, dass VAN LOGHEM der Bakteriologie einen grossen Dienst erwiesen hat, indem er in seinen so suggestiv geschriebenen Veröffentlichungen die Möglichkeit, dass viele der bei Bakterien festgestellten Veränderungen nur phänotypischer Art sind, besonders akzentuierte. Doch erhebt sich die Frage, ob er, insbesondere in seinem letzten Artikel, nicht zu weit geht, hier doch wird die von ihm hervorgehobene Möglichkeit nun auch als Sicherheit betrachtet.

Wenn man vorläufig mit ihm annimmt, dass alle beobachteten Veränderungen irreversibler Art tatsächlich stets einen regressiven Charakter tragen — sodass also die Produkte dieser Veränderungen als Atropheont, Mutilat oder Degenerant bezeichnet werden können — dann bleibt es noch fraglich, ob es einen Grund gibt für den Ausspruch, dass auch diese Veränderungen nicht von genotypischer Art sind. Tatsächlich kann man zustimmen, dass keine Beweise vorliegen, dass sie solcher Natur sind, aber dies gilt schliesslich für das Umgekehrte ebenso.

Hinsichtlich der Veränderungen von zeitlichem Charakter, werden diese von VAN LOGHEM kurzweg als Adaptationsäusserungen gedeutet, welche also als physiologische Reaktionen des Bakterienindividuums auf normale Reize der Umwelt zu betrachten sind.

Es fällt nun auf, dass VAN LOGHEM hier zusammenbringt alle jene Veränderungen, welche direkt unter dem Einfluss bestimmter äusseren Faktoren stehen und beim Wiederherstellen des ursprünglichen Faktorenkomplexes unmittelbar wieder wegfallen und jene Veränderungen, welche sich auch beim Wiederherstellen des ursprünglichen Faktorenkomplexes während kürzerer oder längerer Zeit behaupten. Die erste Art von Veränderungen umfasst tatsächlich solche mit einem abweichenden Phänotypus bei konstant gebliebenem Genotypus und gehört in diesem Gedankengang völlig zum Begriff der Modifikation der Genetiker. Diese Kategorie ist also eine in der Biologie allgemein bekannte Erscheinung; es bedarf keiner weiteren Umschreibung und wurde bereits in § 1 dieses Kapitels von den anderen Variationstypen abgetrennt.

Zweifelsohne ist aber die an zweiter Stelle genannte Kategorie von grösserer Bedeutung; VAN LOGHEM behauptet, dass auch bei dieser



Veränderungen des Genotypus nicht vorkommen. Fragt man sich auf welchen Gründen nun eigentlich diese Behauptung beruht, so erhellt, dass diese sich nur auf die Tatsache stützt, dass unter bestimmten Bedingungen die Ausgangsform mit ihren spezifischen Merkmalen zurück erhalten werden kann. Als charakteristisch für den Gedankengang VAN LOGHEM's sei hier eine kurze Passage aus seiner letzten Veröffentlichung (1937) wiedergegeben.

„Is dit een blijvende wijziging, een verandering van den genotypus, een mutant? Volstrekt niet. Teruggebracht in geschikte middenstoffen herneemt de kloon de eigenschappen, die hem aanvankelijk kenmerkten. Wat wij waarnamen was een *adaptaat*.“<sup>1)</sup>)

Ich will hier dahingestellt lassen, inwiefern tatsächlich die den betreffenden Veränderungstypus kennzeichnende Reversibilität hinlänglich ist um schliessen zu können, dass in diesen Veränderungen der Genotypus unberührt bleibt. Ich werde in Kapitel XII hierauf noch näher eingehen, bemerke aber hier bereits, dass in dieser Hinsicht das Einführen des Termes „Fixat“ als Resultat einer Adaptation, welche „lange Zeit beständig bleibt“ zu denken gibt. Denn es muss hier dann doch an eine sehr lange Zeit gedacht werden, weil es offenbar einer Abgrenzung von der normalen Adaptation bedarf, und doch das Adaptat seinerseits auch schon beträchtliche Zeit beständig bleiben muss, will dieser Begriff nicht in den einfachen Begriff „Modifikation“ untergehen.

Will man aber mit VAN LOGHEM die reversiblen Veränderungen restlos als phänotypische Abänderungen auffassen, dann stellt sich die Frage, inwieweit er gerechtfertigt ist diese Ansicht mit der einer Adaptation zu verbinden. Will diese Begriffsverbindung einen Sinn haben, dann muss sie doch besagen, dass bei den eintretenden Veränderungen von diesem Typus das Individuum (der Klon) sich an die betreffenden Bedingungen anpasst.

Das folgende Zitat aus der jüngsten Veröffentlichung VAN LOGHEM's hebt diesen Gesichtspunkt besonders hervor.

„Het kennen van het persoonlijke voorkomen en wezen van een bacterie geschiedt meer nog dan bij hoogere wezens uit een opzettelijke en proefondervindelijke studie van zijn adaptaties. Aankweeking, zuivere kweek, groei in gesuikerde media, vorming van kolonies,

<sup>1)</sup> „Ist dies eine bleibende Abänderung, eine Änderung des Genotypus, eine Mutante? Durchaus nicht. Zurückgebracht in geeignete Medien bekommt der Klon die Eigenschaften wieder, welche ihn anfänglich kennzeichneten. Was wir beobachteten war ein *Adaptat*“.

groeibelemmering in eigen stofwisselingsproducten — dit alles ver-  
tegenwoordigt tezamen een reeks van extreme en onnatuurlijke  
groeivoorwaarden, *aan welke de bacterie door ons gedwongen wordt  
zich tot het uiterste aan te passen.*"<sup>1)</sup>

Lässt sich nun diese adaptative Vorstellung behaupten, wenn wir die  
in § 2 kurz wiedergegebenen Dissoziationserscheinungen betrachten?

Es scheint mir, dass sich dann sofort ernste Bedenken gegen diese  
Vorstellung ergeben.

In erster Linie müssen wir uns über den Begriff „Adaptation“ im  
Reinen sein. In der Definition „Adaptation“ liegt offenbar die Ansicht  
beschlossen, dass die betreffenden Veränderungen auf die äusseren  
Bedingungen, unter welchen sie auftreten, abgestimmt sind. Die kursiv  
zitierte Passage aus VAN LOGHEM's Veröffentlichung lässt keinen Zweifel  
aufkommen, dass auch er sich auf diesen Standpunkt stellt. In denjenigen  
Fällen, die wir in § 2 als Adaptation im engeren Sinne besprochen haben,  
wie z.B. die allmähliche Anpassung von Bakterien an höhere oder niedri-  
gere Temperaturen, oder an Medien mit bestimmter Konzentration von  
Antiseptika liegt nun auch tatsächlich eine solche Abstimmung der  
Veränderungen auf die Art des die Veränderung bewirkenden Agenzes vor.  
Trifft dies nun ebenfalls für die in § 2 besprochenen Dissoziationser-  
scheinungen zu?

Dazu ist sogleich zu bemerken, dass es in vielen Fällen recht schwierig  
ist auf irgend einen Zusammenhang zwischen der Art des die Verän-  
derung bewerkstelligenden Agenzes und der Veränderung zu schliessen.  
Das einfache Auftreten einer R-Form aus einer daneben primär vor-  
handenen S-Form zwingt zur Frage, warum die feststellbare Verände-  
rungen, wie z.B. die längere Zellform, nun tatsächlich eine „Anpassung“  
bedeutet. Inzwischen sei zugegeben, dass es doch denkbar bleibt, dass  
gerade diese äusseren Veränderungen sekundäre Merkmale sind, welche  
schlechterdings als Ausfluss der eigentlichen physiologischen Verände-  
rung, welche die Adaptation bedeutet, zu betrachten sind.

---

<sup>1)</sup> „Die Kenntnis des persönlichen Vorkommens und Wesens eines Bakteriums  
geht mehr noch als bei höheren Wesen aus einer absichtlichen und experimentellen  
Studie seiner Adaptationen hervor.“

Züchtung, Reinzucht, Wachstum in zuckerhaltigen Medien, Bildung von Kolonien,  
Wachstumshemmung in eigenen Stoffwechselprodukten — dies alles vergegenwärtigt  
eine Reihe von extremen und unnatürlichen Wachstumsbedingungen, *durch welche  
das Bakterium von uns gezwungen wird sich bis zum Äussersten anzupassen*“.

Kursivierung von mir (M.)



Aber selbst dann besteht noch keine Notwendigkeit um in diesem Zusammenhang an eine Adaptation zu denken. Es ist ja doch von einer Verbesserung der Lebensbedingungen des Klons nicht zu sprechen, da doch, wie Kulturen auf festen Nährböden lehren, sich die nicht adaptierte Form unter den gleichen Bedingungen meistens vorzüglich behauptet und vermehrt.

Ein weiteres Argument, welches gegen die Annahme des Adaptationsprinzipes zu sprechen scheint, ist die Überlegung, dass unter einem und demselben Komplex von Bedingungen mehrere, verschiedene Phänotypen erhalten werden.

So beschreibt REED (1937), dass aus einer 24 Tage alten Bouillonkultur, mit der normalen (roten) S-Form von *Serratia marcescens* geimpft, die Typen: mukoid-rot, mukoid-orange rot und mukoid-weiss, aus einer anderen Kultur nach derselben Zeit die Typen: R-rot, R-orange-rot und R-weiss isoliert werden könnten.

Alle diese eingetretenen Veränderungen als „Adaptationen“ zu charakterisieren fällt auf den ersten Anblick schwer. Auch der folgende Gesichtspunkt ist mit dem Adaptationsprinzip nicht leicht in Übereinstimmung zu bringen.

Es ist bei der Dissoziation keine unbekannte Erscheinung, dass unter dem Einfluss eines und desselben Agenzes eine Variante auftreten aber auch wieder zur Ausgangsform zurückschlagen kann. Einige Beispiele mögen diese Aussage veranschaulichen.

Bei *Bac. enteritidis* konnte sowohl die  $S \rightarrow R$ - als auch die  $R \rightarrow S$ -Transformation stattfinden und zwar bei täglicher Überimpfung in normaler Bouillon (WEBSTER und BURN, 1927).

Auch bei *Bac. subtilis* konnte in der Kultur in grossen Mengen Bouillon der Übergang  $S \rightarrow R$  und  $R \rightarrow S$  beobachtet werden (SOULE, 1927).

Beim *Mycobacterium* der Rattenlepra trat auf PETROFF's Nährboden eine  $S \rightarrow R$ - und  $R \rightarrow S$ -Dissoziation ein (KAHN und SCHWARZKOPF, 1933).

Auch diese Fälle scheinen gar nicht zu stimmen mit dem Adaptationsbegriff; von der primär gebildeten, also angepassten Variante ist doch keine weitere Anpassung an die selben äusseren Bedingungen zu erwarten, noch weniger eine Rückkehr zum ursprünglichen, nicht angepassten Zustand. Die Launenhaftigkeit, mit der in vielen Fällen Veränderungen eintreten, ist vom Gesichtspunkt der Adaptation ebenfalls schwer zu erklären. Nicht selten trifft der Fall ein, dass beim Altern einer Reihe von Kulturen, im gleichen Nährmedium und mit demselben Bakterien-



typus geimpft, in verschiedenen Kulturen neue Formen betreffs eines oder mehrerer Merkmale auftreten, während diese in den anderen Kulturen derselben Reihe nicht erscheinen. An dem folgenden Beispiel sei dies gezeigt.

REED (1937) impfte die bereits früher erwähnte S-Form von *Serratia marcescens* gleichzeitig in sechs 500 cc. fassende Kolben mit „beef infusion broth“; nach 24 Tagen kamen nach dem Abstreichen aus einem der Kolben einige mukoide S-Kolonien zum Vorschein (rote, orange-rote, und weisse). Aus zwei anderen Kulturen kamen nach 24 Tagen einige nicht-mukoide R-Kolonien (ebenfalls rot, orange-rot und weiss) zur Entwicklung. In den anderen Kulturen hingegen zeigten sich selbst nach 36 Tagen weder mukoide S- noch nicht-mukoide R-Kolonien, sondern es fanden sich ausschliesslich nicht-mukoide S-Typen vor.

Die Abänderung der Merkmale mukoid  $\rightarrow$  nicht-mukoid und S  $\rightarrow$  R ist also keinesfalls eine notwendige Erscheinung. Aus der Tatsache, dass die genannten Veränderungen fehlen können, folgt, dass diese sogen. Adaptation der Ausgangsform zum Gedeihen der Organismen in der betreffenden Umgebung keineswegs notwendig ist.

Zu alledem kommt noch, dass bei der Dissoziation nicht selten voneinander sehr verschiedene Agenzien zum gleichen Resultat führen.

Die folgenden Beispiele können dies erläutern.

DULANEY (1928) gelang es bei *Bac. coli communis* eine S  $\rightarrow$  R-Dissoziation zu erreichen und zwar sowohl durch altern lassen einer Kultur in einem alkalischen Nährmedium, als auch unter dem Einfluss homologes Antiserums.

KAHN und SCHWARZKOPF (1933) berichteten, dass ein S  $\rightarrow$  R-Übergang bei dem avianen *Mycobacterium tuberculosis* eintrat, einerseits durch eine Tierpassage, oder bei rascher Überimpfung in Glycerin-Bouillon, der inaktives Rattenserum hinzugefügt war, aber auch beim altern lassen von Kulturen bei 37.5° C.

SOULE (1927) erhielt bei *Bac. subtilis* eine S  $\rightarrow$  R- und eine R  $\rightarrow$  S-Transformation beim Züchten in einer reichlichen Menge normaler Bouillon und unter dem Einfluss des homologen Antiserums.

SWINGLE (1935) beobachtete das Auftreten von G-Formen bei *Staphylococcus aureus* nach Abstreichen aus alten Bouillonkulturen und aus Suspensionen von alten Kulturen auf Agar.

Aus diesen Beispielen geht hervor, dass es wohl sehr schwierig ist alle diese nach ganz verschiedenen Reizen eintretende gleiche Veränderungen mit dem Begriff „Adaptation“ in Zusammenhang zu bringen.

Zusammenfassend kann also bemerkt werden, dass es bei der Dissoziation mehrere Erscheinungen gibt, welche auf den ersten Anblick schon sehr wenig zu Gunsten der Adaptationsvorstellung sprechen.

Allerdings können die Anhänger dieser Theorie mit Recht einwenden, dass in der Mehrzahl dieser Betrachtungen die Vorstellung einbezogen ist, dass während des Züchtens eines Mikroorganismus in einem bestimmten Milieu fortwährend derselbe Komplex von äusseren Bedingungen auf den Organismus einwirkt. In Wirklichkeit ist dies aber sicherlich nicht der Fall: man kann gar nicht oft genug darauf hinweisen, dass durch den Stoffwechsel des Organismus die äusseren Bedingungen, welche auf den Organismus einwirken, sowohl hinsichtlich der Art und Quantität der Nährstoffe, als auch hinsichtlich der in das Milieu abgechiedenen Stoffwechselprodukte, eine ununterbrochene Reihe von Veränderungen erfahren.

Mit diesem Gesichtspunkt vor Augen ist es natürlich denkbar, dass eine aus einer S-Form abgespaltene R-Form eine Adaptation an Bedingungen bedeutet, welche in einer späteren Wachstumsphase einer primären Kultur herrschen, auch wenn sich später zeigt, dass sich sowohl diese als auch die primäre S-Form im ursprünglichen, unveränderten Medium in gleichem Masse entwickeln. Das Isolieren einer grossen Zahl von Varianten aus einer und derselben Kultur könnte innerhalb dieses Gedankenganges bedeuten, dass diese verschiedenen Varianten ebenso viele Adaptationen an die verschiedenen Bedingungskomplexe bedeuten, welche sich während der Entwicklung der Kultur darin manifestieren. Die Möglichkeit einer Reversion unter Zuhilfenahme einer Methode, die auch zur primären Bildung der Variante geführt hat, würde sich durch die Annahme erklären lassen, dass die primäre Abänderung in einer anderen Kulturphase eintritt als die Reversion; beide Veränderungen könnten also Adaptationen sein.

Auch die erwähnte Launenhaftigkeit vieler auftretenden Veränderungen und die Erscheinung, dass zum Entstehen einer und derselben Variante verschiedene Agenzien dienen können, brauchen nicht völlig unvereinbar mit der Adaptationstheorie betrachtet zu werden. Aber wohl dürfen wir feststellen, dass eine Annahme dieser Theorie zu mancherlei verwickelten Vorstellungen und Voraussetzungen führt, welche — und dies ist das wichtigste — durchaus nicht auf experimentell unterstützte Überlegungen beruhen.

Man bedenke doch, dass die „Adaptation“ in erster Linie eine Veränderung ist, welche auf das Agens abgestimmt ist, welches sie zustande bringt.



Nun kann man schliesslich für jede Variante wohl postulieren, dass sie eine Abstimmung auf einen unbekanntem Komplex von Bedingungen repräsentiert, dann aber bedenke man, dass zu diesem Schluss jeder Schein eines Beweises fehlt.

Anschliessend sei noch bemerkt, dass JOLLOS (1924) auf Grund seiner Untersuchungen an Paramezieren zu Betrachtungen kommt, welche denjenigen VAN LOGHEM's sehr ähnlich sind. Er konnte bei letztgenannten Organismen eine allmähliche Anpassung an höhere Temperaturen bzw., an bestimmte Konzentrationen von Arsenigsäure, erzielen. Es stellte sich heraus, dass die eingetretenen Veränderungen, welche sich längere oder kürzere Zeit behaupten können, auf die Dauer doch immer völlig abklängen.

Nach JOLLOS sollte es sich hierbei handeln um nicht-erbliche Veränderungen, welche er als „Dauermodifikationen“ bezeichnet.

Hinsichtlich dieser Ergebnisse hat er im Jahr 1924 ein Plädoyer gehalten den Begriff der (adaptativen) „Dauermodifikation“ auch für die Bakterienveränderungen einzuführen.

Hieraus erhellt also, dass JOLLOS sich stark dem VAN LOGHEM'schen Standpunkt nähert. Allerdings übte der letztgenannte Forscher auf den Vorschlag JOLLOS' eine scharfe Kritik, weil dieser Ausdruck, insofern man an der in der Biologie gangbaren Definition festhält, eine innerliche Kontradiktion darstellt.

Auffallend ist die ausdrückliche Bemerkung von JOLLOS, dass die Auffassung BEIJERINCK's über die reversible Mutabilität als Ursache der eintretenden Veränderungen gänzlich verworfen werden muss, da diese Erscheinung vollkommen in Widerspruch steht mit „dem konstanten Verhalten sämtlicher uns bekannten echten Mutationen bei den Infusorien, sowohl wie bei Pflanzen und Tieren“.

In wie weit diese in 1924 geäusserte Ansicht heutzutage noch gilt, wird im Folgenden näher besprochen.

Ausser der Mutations- und der Adaptationstheorie wurde zur Erklärung der Dissoziationserscheinung noch eine ganz andere Theorie entwickelt, welche oftmals als die zyklische Theorie bezeichnet wird.

Wenn man bei Bakterien von einer zyklischen Entwicklung spricht, dann bezieht sich dies gewöhnlich nur auf den Entwicklungsprozess: Stäbchenbakterium → Spore → Stäbchenbakterium.

Hier sind also zwei Stadien zu unterscheiden: das Stäbchen ohne Spore und jenes mit Spore bzw. die befreite Spore.



Was die nicht-sporenbildenden Bakterien anbelangt, stellt der in bestimmten Fällen beobachtete feinkörnige Zerfall beim Altern mancher Kulturen möglicherweise auch einen Dauerzustand dar, der zur Erhaltung der Art führt, weil die Kulturen in dieser Form sehr lange Zeit lebensfähig bleiben (VIERTHALER, 1937).

Man könnte die „Granula“ nun gewissermassen den Sporen gleich stellen und daher auch bei den nicht-sporenbildenden Bakterien den Begriff Zyklus anwenden. Auch hier gilt dies dann nur für die Aufeinanderfolge: normales Bakterium → Granula → normales Bakterium.

Im Gegensatz hierzu hat ENDERLEIN im Jahre 1915, und später ausführlicher in 1925, eine sogenannte zyklonenetische Theorie ausgearbeitet, nach welcher es sich gerade bei der Dissoziation um eine zyklische Entwicklung der Bakterien handelt, wobei vegetative Vermehrung mit geschlechtlicher Reproduktion abwechseln soll.

„Die Cyclogenie der Bakterien ist der Kreislauf der morphologischen Entwicklung durch die Summe aller Generationen mit der einfachsten morphologischen Einheit beginnend bis zum höchsten morphologischen Aufbau, welcher der einzelnen Spezies zukommt, und endet wieder mit der Einheit. Bei der Ontogenie werden die verschiedenen Stadien der Phylogenie in gedrängter Form an *einem* Individuum durchlaufen, während bei der Cyclogenie die einzelnen phyletischen Stadien im Verlauf von zahllosen Generationen von Individuen wiederholt werden.“

ENDERLEIN, welcher bei der Auseinandersetzung seiner Theorie u.a. den Entwicklungsgang eines Insektes mit seinem Ei-, Larven-, Puppen- und Imago-Stadium zum Vergleich heranzieht, betrachtet das Vorkommen einer sexuellen Reproduktion im Zyklus der Bakterien als eine vollendete Tatsache.

Unabhängig von der Frage, ob ENDERLEIN tatsächlich dazu berechtigt ist, kann man feststellen, dass in dieser Theorie der sexuelle Prozess nur für eine der vielen Veränderungen verantwortlich ist, welche sich im Leben der Bakterien vollziehen können. Dies bedeutet also, dass ENDERLEIN ausserdem eine Reihe einander auf folgende vegetative Stadien annimmt, welche jedes für sich als ein mehr oder weniger lange Zeit weiter gewachsener Klon anzusehen ist und also eine gewaltige Anzahl von Individuen umfassen.

Durch diese Tatsache weicht also die Zyklode stark von dem ontogenetischen Zyklus (dem Entwicklungszyklus des Individuums) eines höheren Organismus ab.

Die Zyklogenie der Bakterien wird dann also ein in der Biologie ganz allein stehender Fall einer zyklischen Entwicklung, was jedenfalls nicht zur Wahrscheinlichkeit dieser Auffassung beiträgt.

ENDERLEIN ist ausserdem gezwungen der Tatsache Rechnung zu tragen, dass dieser Zyklus oft nicht gänzlich durchlaufen wird. Als Ursache dieser Fixation der Stadien spricht er das Fehlen bestimmter äusserer Bedingungen an, welche zur Vollendung des Zyklus notwendig gewesen waren.

ENDERLEIN hat durch das Einführen einer Unzahl neuer Terme und Begriffe seine Theorie sehr verwickelt und beinahe unleserlich gemacht; auch unterlässt er eine gründliche Prüfung seiner Theorie an die experimentellen Daten bezüglich der Dissoziation.

Seine grösstenteils hypothetische Abhandlung ist für eine tiefere Erfassung des Dissoziationsproblems dann auch von zweifelhaftem Wert.

Das Prinzip des Entwicklungszyklus als Basis bakterieller Variabilität erhielt in HADLEY einen begeisterten Anhänger. In seiner jüngsten Veröffentlichung kommt HADLEY (1937) zu einer Einteilung der bakteriellen Variationen in drei Gruppen:

1. Ontogenetische Variationen.
2. Induzierte Variationen; sie umfassen alle Modifikationen unter dem Einfluss äusserer Bedingungen.
3. Fluktuationen, charakteristisch für alle lebenden Wesen.

Die für die Dissoziation charakteristischen Kulturphasen M, S, R, usw. sind nach HADLEY in der 1. Gruppe unterzubringen. Es sollen diese Phasen als zeitlich fixierte „cyclostages“ in der Entwicklung der Spezies-Mikrophyt anzusehen sein. Ihr Auftreten ist nur von den Faktoren, welche für die ontogenetische Entwicklung bestimmend sind, abhängig, sodass sie also ausserhalb das Gebiet der eigentlichen Variabilität fallen. Im Gegensatz hierzu stehen z.B. Veränderungen in der Farbe, die auf anderen Faktoren beruhen, wie vielleicht äussere Bedingungen oder nukleare Reorganisation.

„... the culture phases (mucoid, smooth, rough, etc.) assume the new significance of stages in the course of the development of the species-microphyt (ontogeny), and not that of variants within the common meaning of that term.“

HADLEY betrachtet die R-Phase als den Hohepunkt der progressiven, zytologischen Entwicklung. Diese „fungoide“-Phase vergegenwärtigt die reproduktiv reife Form, aus welcher durch Befreiung der Gonidien der



Zyklus aufs Neue beginnt, mit der G-Phase als niedrigstes Stadium (HADLEY, 1931).

In seiner Veröffentlichung aus dem Jahr 1937 vergleicht er die Kulturphasen der Bakterien mit den ontogenetischen Fragmenten irgendeines konidienbildenden Schimmelpilzes. HADLEY betont, dass bei einem Schimmelpilz die Entwicklungsstadien (die ontogenetischen Fragmente) als vegetatives Myzel—Konidiophoren—Konidien überwiegend aus kohärenten Zellorganisationen bestehen, welche alle in planmässiger Aufeinanderfolge zu einer organischen Einheit kombiniert sind.

Bei den Bakterien sollen die Kulturphasen gesonderte, nicht oder sehr wenig kohärente Zellorganisationen bilden, welche aber übrigens völlig mit den zu einer Ganzheit verbundenen mehr oder weniger kohärenten Zellorganisationen des Schimmelpilzes zu vergleichen sind.

HADLEY betrachtet daher in dem von ihm entworfenen ontogenetischen Zyklus den Bakterien-Mikrophyt, das Individuum also, als die Totalität aller Kulturphasen samt den in ihnen vorhandenen Zellen.

Bemerkt sei hier, dass wir diese Ansicht bei ENDERLEIN nicht vorfinden; aus der von ihm gegebenen Formulierung seiner Zyklogenie geht deutlich hervor, dass er jede Bakterienzelle als ein Individuum betrachtet.

Wenn wir nun HADLEY's Ansichten an den Dissoziationserscheinungen prüfen, dann müssen wir uns fragen, ob wirklich beim Auftreten der Kulturphasen M, S, R, G eine zyklische, also „gerichtete“ Aufeinanderfolge ersichtlich ist.

Bei der Betrachtung des grossen Tatsachenmaterials geht nun ohne weiteres hervor, dass die Bedingung eines solchen „gerichtet sein“ sicher nicht allgemein erfüllt ist.

Allerdings sind in bestimmten Fällen keine Argumente gegen das Bestehen eines derartigen Zyklus anzuführen. Denken wir uns z.B. den Fall einer Bakterienart, von der wir eine S, R und eine oder mehrere intermediäre Varianten (O) kennen. Wenn nun die  $S \rightarrow R$ -Veränderung sich über die intermediären Formen vollzieht, und die Reversion  $R \rightarrow S$  sprungweise stattfindet, dann kann der letztgenannte Übergang einerseits als eine Reversion, eine Rückkehr auf demselben Weg aber mit dem Übergehen der O-Stadien, andererseits als eine Progression, ein Schliessen des Zyklus aufgefasst werden.

Übersieht man einigermassen die bereits bekannten Tatsachen bezüglich des Dissoziationsphänomens, dann findet man indessen genug Fälle, worin das gerichtete, zyklische Prinzip verletzt wird.

Hierunten folgen einige Beispiele.



BLAKE und TRASK (1933) stellten bei dem  $M \rightarrow S$ -Übergang<sup>1)</sup> vom Typus I *Pneumococcus* fünf intermediäre Varianten (Ia, Ib, usw.) fest, wobei zwei, Ib und Ic, gut in Reinkultur gebracht werden konnten.

Das intermediäre Stadium Ic konnte sich sowohl progressiv als auch völlig regressiv verhalten:  $S \leftarrow Ic \rightarrow M$ .

Wir haben hier also einen Fall unzweifelhafter Reversion über einen Teil des Trajektes  $M - S$  vor uns; dies darf natürlich bei einem Zyklus nie vorkommen.

TORREY und MONTU (1936) haben bei *Escherichia coli* im Trajekt  $S - R$  etwas Ähnliches beobachtet; ein intermediärer Typus  $O_2$  konnte einerseits progressiv bis zum extremen, stabilen R-Typus, andererseits reversiv bis zur Ausgangsform S dissoziieren.

Es ist nicht ausgeschlossen, dass bei Bakterienarten, in deren Dissoziationsmuster deutlich ein M-, S- und R-, event. auch ein G-Typus erkannt worden ist, z.B. bei *Pneumococcus*, eine gerichtete Aufeinanderfolge besteht und zwar in dem Sinne, dass aus dem M-Typus selten oder nie direkt R, sondern S entsteht, während der S-Typus seinerseits die R-Form erzeugen kann. Trotz diesser gerichteten  $M \rightarrow S \rightarrow R$ -Veränderung wird doch das Zyklusprinzip gestört, weil über einen oder mehrere Teiltrajekte eine Reversion auftreten kann.

So finden z.B. bei *Pneumococcus*, *Bact. dysenteriae*, *Bact. granulosis*, *Micrococcus tetragenus*, *Serratia marcescens* zwischen M und S, S und R, S und G sehr allgemein Reversionen statt.

In der bereits erwähnten Veröffentlichung über die Dissoziationsercheinungen bei *Serratia marcescens* kommt auch REED (1937) zum Schluss, dass für diese gewöhnlich rote Bakterienart von einem Zyklus nicht die Rede sein kann. Neben dem ursprünglichen, roten S-Typus hat er u.a. einen roten R- und zwei verschiedene rote M-Typen isolieren können. Die beiden M-Typen zeigten die mukoide Gestalt der S- und der R-Form (Auftreten von eingekapselten Zellen).

Bei diesen rot gefärbten Varianten hat er die folgenden Übergänge beobachtet:  $M_{(S)} \xleftrightarrow{S} S$ ;  $S \xleftrightarrow{R} R$ ;  $M_{(S)} \rightarrow M_{(R)}$ ;  $M_{(R)} \rightarrow R$ .

Es braucht keine nähere Erläuterung, dass hier für das zyklische Prinzip jede Anweisung fehlt. Das Ganze zeigt sich deshalb noch ver-

<sup>1)</sup> Diese Forscher gebrauchten an Stelle von M und S die Bezeichnungen S und R. Durch die Untersuchung DAWSON's, der für *Pneumococcus* den wahren R-Typus entdeckte, wurde das Dissoziationsmuster verändert. Was früher S hiess (die gekapselte Form) wird nun M genannt, während die ehemals als R bezeichnete Form nun als S betrachtet wird.

wickelter, weil ähnliche Beobachtungen auch für die orange-roten und farblosen Varianten gemacht werden.

Eine weitere Schwierigkeit zur Annahme der zyklischen Theorie in ihrer ursprünglichen Form bildet der Umstand, dass in ihr nur den morphologischen Veränderungen Rechnung getragen wird, während die nicht weniger wichtigen physiologischen Veränderungen ohne weiteres bei den morphologischen Stadien eingereiht werden. Bis vor kurzem konnten die Anhänger der zyklischen Theorie in dieser Hinsicht noch mit Recht betonen, dass jede Entwicklungsphase nun einmal ihre eigenen physiologischen Merkmale hat.

In der allerletzten Zeit ist nun jedoch die Zahl der Fälle von vollkommen unabhängiger Variation von Eigenschaften (Seite 102) stark zugenommen und daher muss man versuchen beim Festhalten an dieser Theorie jetzt auf andere Weise aus den Schwierigkeiten zu kommen.

HADLEY (1937) schlägt folgenden Weg ein. Er weist darauf hin, dass in seinem Gedankengang die Kulturphasen ausserhalb der eigentlichen Variabilität fallen, doch dass diese letztere gerade die Veränderungen physiologischer Eigenschaften, wie z.B. Farbenänderungen, umfasst. Die letztgenannten Veränderungen wurden dann auf ganz andere Faktoren beruhen, vielleicht auf äussere Bedingungen oder auf nukleare Reorganisation.

Eine solche Trennung zwischen Veränderungen morphologischer und physiologischer Art mutet nun wohl sehr gekünstelt an. Besonders weil neben den getrennten Veränderungen andererseits doch so oft Koppelung beider Veränderungstypen auftritt.

Aus dem oben Angeführten wird wohl deutlich geworden sein, dass eine Annahme der HADLEY'schen Auffassung grosse und verschiedene Schwierigkeiten in dem Weg stehen.

Es ist bemerkenswert, dass die von NEISSER und MASSINI propagierte, besonders aber von BEIJERINCK entwickelte Auffassung, dass die bakterielle Variation als Mutation zu betrachten ist — später durch andere Ansichten verdrungen — seit 1935 in der Dissoziationsliteratur von einigen amerikanischen Forschern wieder aufgenommen wurde. Der direkte Anlass hierzu liegt in der rezenten Entwicklung der Mutationslehre, welche Entwicklung besonders durch die neueren *Drosophila*-Untersuchungen angebahnt worden ist.

Während die wichtigsten Bedenken gegen die Anwendung der Mutationstheorie auf die Erscheinungen bakterieller Veränderlichkeit im unstabilen Charakter dieser gelegen war, zeigt sich nun aus den schönen



Untersuchungen von PATTERSON und MULLER, DEMEREC, TIMOFÉEFF-RESSOVSKY u.a., dass auch bei *Drosophila* reversible Genmutationen keineswegs selten sind. Auf diesen Untersuchungen fussend gibt LINDEGREN (1936) die folgende Übersicht über die möglichen Ursachen der bakteriellen Variabilität:

1. *Zyklische Veränderungen.*

2. Veränderungen, welche nicht auf einer Abänderung der genetischen Konstitution beruhen, wie *Modifikation, Dauermodifikation, somatische Modifikation*, wobei sich die beiden letzteren längere oder kürzere Zeit behaupten.

3. *Heterokaryosis.*

4. *Hybridisation.*

5. *Mutation.*

Da LINDEGREN annimmt, dass eine sexuelle Reproduktion bei Bakterien vorkommen kann, schaltet er die Möglichkeit einer Hybridisation nicht aus. Er bemerkt daher, dass wir dann annehmen müssen, dass die betreffenden Bakterienarten diploide heterozygote Organismen sind. Jedweder Beweis hierfür fehlt jedoch und LINDEGREN achtet es viel wahrscheinlicher, dass Bakterien haploid und also erblich homogen sind.

Durch die Tatsache, dass die meisten Bakterienvarianten plötzlich erscheinen und wieder leicht zum originellen Typus zurückschlagen können, stimmen die meisten Bakterienvarianten mit den reversiblen Genmutationen, welche bei *Drosophila* in bestimmten Loci auftreten, überein. Obwohl andere Mutationen wie die Non-Disjunktion, Fragmentation, Duplikation usw. von Chromosomen nicht völlig auszuschliessen sind, ist wahrscheinlich die Genmutation, als die leichtest reversible Mutation, auch die Ursache der meisten Bakterienvariationen.

Auch DESKOWITZ (1937) weist in seiner Veröffentlichung über die un-stabilen Varianten hin, dass die bei der Dissoziation allgemein auftretenden un-stabilen Variationen mit den labilen Genmutationen bei höheren Formen sehr nahe verwandt zu sein scheinen.

Er bezieht sich auch auf die Untersuchungen DEMEREC's über den Effekt von Temperaturänderungen und Röntgenbestrahlung auf die Mutationsrate hinsichtlich eines bestimmten Merkmals, welche Mutationen sich in vielen Fällen von reversibler Art zeigten.

REED (1937) kommt durch seine Dissoziationsuntersuchungen an *Serratia marcescens* zum Schluss, dass seine Ergebnisse unmöglich mit einer zyklischen Theorie in Übereinstimmung zu bringen sind und dass



es nach dem heutigen Stande der Mutationslehre mehr auf der Hand liegt diese Befunde als Genmutationen zu betrachten.

Ich werde nun erst meine eigenen Resultate über die Dissoziation bei *Betabacterium vermiforme* anführen und dann in Kapitel XII die Möglichkeit um die Bakterien-Dissoziation auf Mutation zurückzuführen eingehender diskutieren.

## KAPITEL XI.

### EIGENE BEOBACHTUNGEN ÜBER DIE DISSOZIATION VON *BETABACTERIUM VERMIFORME*.

#### § 1. EINLEITUNG.

Wie bereits in Kapitel III § 2 berichtet wurde, trat bei der Weiterzuchtung des aus den Tibi-Klumpchen isolierten Bakteriums auf Glucose-Hefewasser-Agar eine Dissoziation ein. Es entstand nämlich neben dem auf der ersten Platte ausschliesslich anwesenden „rauhem“-Kolonietypus ständig noch ein zweiter, zuweilen noch ein dritter Typus.

Diese mit grosser Regelmässigkeit eintretende Variation veranlasste mich schliesslich das Dissoziationsproblem bei *Betabacterium vermiforme* möglichst eingehend zu untersuchen. Ich entschloss mich darum sowohl die ursprüngliche Form als auch die primären Varianten unter verschiedenen Bedingungen zu kultivieren um nachzuforschen, inwiefern dadurch noch andere Formen zu erhalten waren.

In den folgenden Paragraphen werde ich erst über die Resultate meiner Untersuchung berichten, um schliesslich im letzten Paragraphen eine Besprechung dieser Resultate und eine kritische Betrachtung, inwieweit aus diesen Resultaten Argumente für die Wahrscheinlichkeit der verschiedenen Variationstheorien zu entlehnen sind, zu geben.

#### § 2. DIE DISSOZIATION VON *BETABACTERIUM VERMIFORME* BEI DER ZÜCHTUNG AUF FESTEN NÄHRMEDIEN.

Bei meiner Untersuchung zeigte es sich bald, dass *Betabacterium vermiforme* auf allen gebrauchten festen Nährböden wie: Glucoseagar, Glucose- und Saccharosegelatine einer Dissoziation unterlag. Hierunter werde ich das Bild der Kulturen auf zwei dieser Platten in Einzelheiten beschreiben.

##### a. Hefewasser-Glucose-Agarplatten (ohne Kreide).

Zum Studium der Dissoziationserscheinung wurde mit langen Reihen von Subkulturen bei 30° C gearbeitet. Wie bereits bemerkt, war in diesen

Reihen eine gute und konstante Entwicklung auf diesem Nährmedium nur dann gesichert, wenn ich anaerob oder zum mindesten unter sehr stark verminderter Sauerstoffspannung züchtete. Nach 3—4-tägiger Bebrütung wurden die Platten auf ihre Kolonieförmigkeiten hin untersucht.

Wenn man nach einer langen, ununterbrochenen Periode von Tibi-Gärung in Saccharose-Feigenwasser — mit regelmässiger Erneuerung des Mediums — ein vitales Tibi-Klumpchen in sterilem Wasser zerreibt und diese Suspension auf Glucoseagar abstreicht, dann entwickelt sich ein einheitliches Plattenbild aus rauhen, platt-linsenförmigen Kolonien (1.5-3 mm Durchmesser), deren Ränder unregelmässig gewellt sind. Nach der gebräuchlichen Terminologie gehört diese Kolonie zum R-Typus.

Bei einer schwachen mikroskopischen Vergrösserung zeigten diese R-Kolonien ein mit schmalen und willkürlich verlaufenden Linien besetztes Muster; in dessen Zentrum konnten durchwegs einige dunklere Flecken, Schattierungen, beobachtet werden (Abb. 19).

Wenn man aber von der ersten Platte eine freiliegende R-Kolonie, suspendiert und auf eine zweite Platte abstreicht, dann entstanden neben völlig rein aussehenden R-Kolonien und R-Kolonien mit grösseren und kleineren (manchmal mikroskopisch kaum sichtbaren) marginalen Auswüchsen in fast allen Fällen auch grosse (3 mm bis zu 1 cm), sehr dünne und platte Kolonien, entweder mit oder ohne glattem, erhobenem Zentrum. Die glänzende Oberfläche der breiten, dünnen Randzone war meist sehr feinfaltig und der Kolonierand unregelmässig (Abb. 20).

Es wurde nun die merkwürdige Feststellung gemacht, dass beim Abstreichen von ein wenig Material des R-Kolonietypus auf Probeplättchen von Saccharosegelatine immer eine Wandstoffproduktion auftrat, während beim Abstreichen von Material aus dem dünnen, grossen Kolonietypus eine solche Wandstoffproduktion niemals stattfand.

Die Variante mit ihren grossen, dünnen Kolonien werde ich künftig hin als der O-Typus bezeichnen. Dieser Typus ist also u.a. durch den Verlust des Wandstoffbildungsvermögens gekennzeichnet.

Es sei noch bemerkt, dass beim Abstreichen von Tibi-Körner-Suspensionen auf Platten ausnahmsweise der O-Typus sogleich als selbständige Kolonie zum Vorschein kommen kann.

War die Aussaat sehr stark gewesen, dann konnte man beim genauen Studium der R-Kolonien mit der Lupe bei einigen dieser einen mehr oder weniger breiten, marginalen Auswuchs unterscheiden. Es konnte dieses Merkmal als Indikator der eingetretenen Dissoziation gelten. War nämlich dieser Auswuchs breit genug um von ihm eine Suspension zu



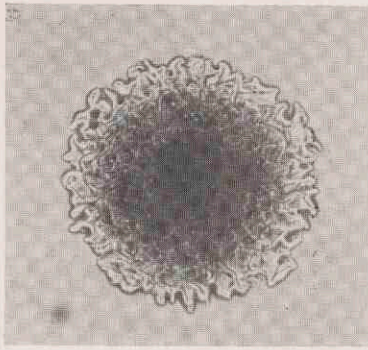


Abb. 19.

R-Kolonie von einem Hefewasser-2% Glucoseboden, worauf eine Tibi-Körner-Suspension abgestrichen war. Vergrößerung 20×.

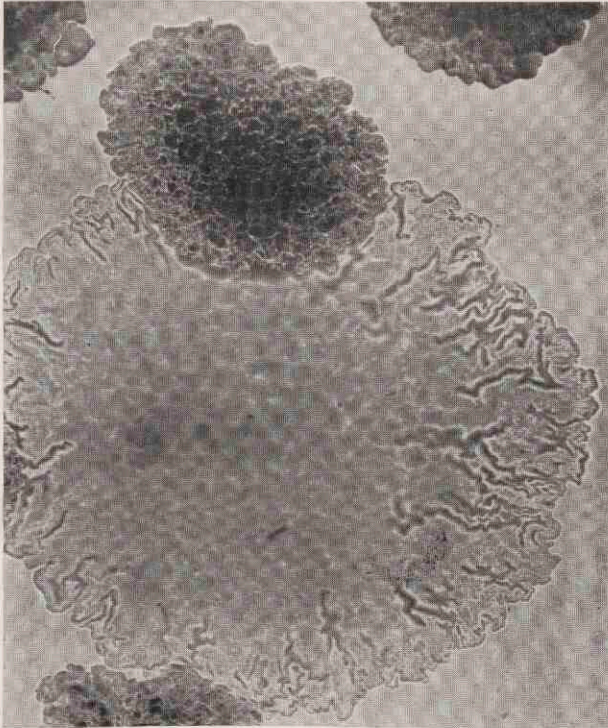


Abb. 20.

R-Kolonien und eine plakartige, sehr dünne O-Kolonie auf Hefewasser-2% Glucoseagar. Vergrößerung 20×.

gewinnen ohne auch Material vom innern Teil der Kolonie mitzunehmen, dann ergab die Aussaat ebenfalls überwiegend O-Kolonien.

Je länger die Weiterzüchtung der R-Kolonien fortgesetzt wurde, desto deutlicher lässt die Dissoziation sich gelten.

Der Prozentsatz der selbständigen O-Kolonien, auf die totale Anzahl von Kolonien berechnet, kann grosse Schwankungen zeigen.

Zuweilen können die Platten völlig frei sein an selbständige O-Formen, doch zeigen dann immer einige R-Kolonien einen marginalen Auswuchs auf. In der Regel liegt der genannten Prozentsatz jedoch zwischen 1 und 5%, ist also ziemlich klein. Es kann jedoch auch vorkommen, dass in der Kulturreihe entweder auf hintereinanderfolgenden Platten oder unregelmässig dieser Prozentsatz beträchtlich höher ist z.B. 10%, 15% oder 20%.

Auf den oben erwähnten Platten kommen zuweilen ausser den R- und O-Typen noch Kolonien von anderer Form zum Vorschein. Sie sind kleiner (0,5—1.5 mm), rund oder etwas unregelmässig geformt und besitzen eine glatte, feuchtglänzende Oberfläche (siehe Seite 136).

Im Sinne der gebräuchlichen Terminologie ist dieser Typus als S zu bezeichnen; in durchfallendem Licht zeigt sich die Kolonie homogen, mitunter sind nur sehr schmale, feine Linien zu unterscheiden. Hinsichtlich der Wandstoffproduktion reagiert dieser S-Typus, gleich der O-Form, auf Saccharosegelatine negativ; in § 5 wird näher auf diese O- und S-Formen eingegangen werden.

Ein näheres Studium des R-Typus, in welcher Form *Betabacterium vermiforme* offenbar im Tibi-Konsortium vorkommt, lehrte, dass beim fortgesetzten Kultivieren die R-Kolonien zuweilen verschiedene Grade von „roughness“ zeigen können. Selbst auf einer und derselben Platte können diese Unterschiede zum Ausdruck kommen. So stellte sich heraus, dass die Oberfläche der Kolonie anstatt normal rauh zu sein, auch in geringerem Masse rauh, ja sogar glatt sein kann. In solchen Fällen ist dann auch der Rand weniger unregelmässig, oftmals fast ohne Buchten.

Diese Kolonie mit S-artigem Charakter war jedoch durch seine Grösse und trocken-glänzende Oberfläche von dem eigentlichen, nicht-dextranbildenden S-Typus deutlich zu unterscheiden. Dieser S-artige Typus hat das Vermögen zur Bildung des Wandstoffes aus Saccharose beibehalten. Bei Weiterzüchtung dieses leichtrauen Typus können sowohl dieselbe Kolonieformen, als auch zu 100% normal rauhe Typen zur Entwicklung kommen. Es war sehr auffällig, dass oft gleichzeitig mit



diesen S-artigen Typen auch grosse, platte, unregelmässige Kolonien mit einer granularen, fein-faltigen Oberfläche vorkamen.

Sie schienen auf den ersten Anblick dem dünnen, nicht-dextranbildenden O-Typus zu gleichen, jedoch hatten auch sie die Möglichkeit zur Dextranbildung nicht verloren. Nach einiger Übung konnte ich diese beide platte Formen auch mikroskopisch unterscheiden. Der früher beschriebene nicht-dextranbildende Typus zeigt sich in seinem plakartartigen Wachstum doch noch um vieles dünner und mit einer glänzenderen Oberfläche versehen. Dieser O-artige Typus liess meist bei Weiterzüchtung gleich wieder in vollem Umfang normale rauhe Kolonien entstehen.

Zusammenfassend können wir also feststellen, dass die direkt aus den Tibi-Körnern erhaltene R-Form an erster Stelle eine nicht reversible Dissoziation zeigt in einer O- und einer S-Form, welche beide durch den Verlust des Wandstoffbildungsvermögens gekennzeichnet sind. Daneben tritt ein zweiter Dissoziationsvorgang auf, der zu Kolonieförmigen führt, welche annähernd den O- und S-Typen gleichen, aber das Wandstoffbildungsvermögen beibehalten haben und welche ausserdem leicht eine Reversion zur R-Form zeigen.

b. *Hefewasser-Gelatine-10% Saccharoseplatten.*

Wurde auf diesem Nährboden die Suspension eines fein zerriebenes Tibi-Klümpchens abgestrichen, dann zeigte die Platte nach 5—6 Tagen bei 22° C *ausschliesslich* gelatinöse Kolonien entweder in Form von Scheibchen oder in Form unregelmässiger Klümpchen (Seite 37-38).

Mit Hinsicht auf das unter a. beschriebene war es daher wahrscheinlich, dass die in dieser Weise erhaltene Form sich mit der als R-Typus beschriebenen Form der Glucoseplatten identifizieren lässt. Diese Vermutung wurde durch „Cross“-Impfungen bald bestätigt.

Wenn man aber eine Suspension einer derartigen gelatinösen Kolonie von dieser Platte auf eine zweite Platte abstreicht, und auf ähnliche Weise die Subkultur längere Zeit fortsetzt, so ergeben diese Platten Mischkulturen von gelatinösen und kleinen trockenen Kolonien. Bei diesen letzteren, welche durch ihre Wachstumsart offenbar das Vermögen Wandstoff zu bilden nicht mehr besitzen, kann man zwei verschiedene Kolonietypen vorfinden:

1. Kolonien von 1.5 mm Grösse, welche gänzlich platt und dünn sind oder welche ein dickeres, erhobenes Zentrum haben und von einer verhältnismässig breiten, sehr dünnen Randzone umgeben sein.
2. Kleinere, 0.5 mm grosse Kolonien, welche nur aus dem verdickten



Zentrum des vorigen Typus zu bestehen scheinen und keine Randzone besitzen.

Züchtet man den ersten Typus auf Glucoseagar, dann erscheinen entweder ausschliesslich oder doch überwiegend die grossen platten Kolonien des O-Typus; Weiterzüchtung des zweiten Typus ergibt auf Glucoseagar fast immer Mischplatten von S- und O-Formen.

Damit wird deutlich, dass die beiden trockenen Kolonietypen der Saccharosegelatineplatten identisch sind mit den O- und S-Typen auf Glucoseagar.

Der Prozentsatz der trockenen Kolonien, auf die Gesamtzahl berechnet, kann ebenfalls stark schwanken und zwar von einigen Prozenten (bisweilen „nihil“) bis zu 50—60%; im allgemeinen kommen die Werte 10—30% am meisten vor. Es kann sich auch herausstellen, dass man in aufeinanderfolgenden Plattenkulturen einen nahezu konstant bleibenden oder innerhalb enger Grenzen schwankenden Prozentsatz (z.B. von 5—10%, 10—20%, 20—30%) trockener Kolonien erhält.

Der schwankende Prozentsatz trat nicht nur beim Abstreichen aus Suspensionen gelatinöser Kolonien von *aufeinanderfolgenden* Platten, sondern auch von *einer und derselben* Platte ein. Beim Abstreichen aus Suspensionen von R-Kolonien, herrührend von Glucoseagar, auf Saccharosegelatine stellt sich heraus, dass der Prozentsatz trockener Kolonien in befriedigender Weise mit dem von O (event. O + S) auf Glucoseagar übereinstimmt.

Ist dieser Prozentsatz nicht gross (was durchwegs der Fall ist), dann kommt beim Abstreichen aus der Suspension gelatinöser Kolonien von einer solchen Gelatineplatte auf eine folgende meistens sogleich der für Gelatine höhere Prozentsatz zum Vorschein. Ungeachtet des bereits unter normalen Bedingungen auftretenden, wechselnden Prozentsatzes habe ich noch versucht, ob eine Züchtung auf Saccharosegelatine bei einer höheren Temperatur, nämlich 30° C, oder unter anaeroben Bedingungen in Wasserstoffatmosphäre oder in reiner Kohlensäure einen Einfluss auf die Anzahl trockener Kolonien hat. Es zeigte sich jedoch, dass auch unter den obengenannten Bedingungen Werte zwischen 10—40% erzielt wurden, während die Fluktuation in der gleichen Weise auftrat.

### § 3. DIE DISSOZIATION VON *BETABACTERIUM VERMIFORME* BEI DER ZÜCHTUNG IN FLÜSSIGEN NÄHRMEDIEN.

Im vorhergehenden Paragraphen haben wir beschrieben, dass bei der Weiterzüchtung von *Betabacterium vermiforme* auf festen Nährböden

durch die im ursprünglichen Kolonietypus auftretende Dissoziation ständig eine grössere oder kleinere Anzahl Variantenkolonien zur Entwicklung kommen, welche keinen Wandstoff zu bilden vermögen. Es war nun wünschenswert zu untersuchen, ob auch bei der Züchtung in flüssigen Nährmedien eine Dissoziation eintritt.

Zu diesem Zweck impfte ich eine möglichst reine R-Kolonie von einer Glucoseagarplatte, auf welche eine Tibi-Körner-Suspension abgestrichen war, in eine Kulturröhre mit 2% Glucose-Hefewasser. Nach einigen Tagen war eine gute Entwicklung festzustellen, wobei sich schliesslich am Boden ein feinflockiger Niederschlag von Bakterien absetzte. Es sei daran erinnert, dass in diesem, keine Saccharose enthaltenden Medium Wandstoffbildung nicht auftritt. Von dieser ersten Kulturröhre wurde nun in Abständen von 2—5 Tagen regelmässig ein Tropfen in die frische Kulturflüssigkeit übergeimpft.

Zugleichzeitig wurde aus der für die Überimpfung benutzte Röhre, eventuell nach passender Verdünnung, auf Saccharosegelatine abgestrichen.

Auf diese Weise wurde eine lange Reihe aufeinanderfolgender Flüssigkeitskulturen untersucht, wobei das Folgende beobachtet wurde. Auf der Saccharosegelatineplatte, welche von Material aus der ersten Kulturröhre stammte, war die Anzahl trockener Kolonien niedrig:  $\pm 2\%$ ; etwa ein gleicher Wert wurde auch direkt aus der Suspension der bewussten R-Kolonie auf Glucoseagar bzw. Saccharosegelatine erhalten.

Auch in den erstfolgenden Kulturröhren war die Anzahl sehr niedrig und schwankte zwischen 0.3% und 2%. Bei der 8ten Kultur betrug die Zahl 1%; von der Kultur No 9 ab kam bei allen folgenden Kulturen keine einzige trockene Kolonie mehr zur Entwicklung, bei einer mittleren Koloniezahl auf der Platte von 200—300. Der Versuch wurde bis zur 50sten Kultur fortgesetzt (Tabelle II).

Sehr auffallend war, dass bei Weiterzüchtung der gelatinösen Kolonien von diesen einheitlichen Platten sogleich wieder die für Gelatine durchwegs hohe Anzahl trockener Kolonien zu beobachten ist.

Für eine zweite Kulturreihe in Glucose-Hefewasser wurde von der Suspension einer zerriebenen gelatinösen Kolonie ausgegangen. Es stellte sich heraus, dass bei Impfung einer solchen Suspension, aus der beim direkten Abstreichen auf Kontrolle-Gelatineplatten 20% trockene Kolonien zur Entwicklung kamen, die erste Kulturröhre 25% Variantenkolonien auflieferte. Bei der zweiten Röhre betrug die Anzahl 18%. Nachdem der Prozentsatz trockener Kolonien aus den nächstfolgenden

TABELLE II.

Prozentsatz der Variantenkolonien erhalten nach Abstreichen aus einer Reihe von Kulturröhren mit Hefewasser-5% Glucose; initiale Impfung mit einer Suspension einer R-Kolonie von Glucoseagar, worauf eine Suspension eines Tibi-Klumpchens abgestrichen war.

	Prozentsatz trockener Kolonien
Kontrolleplatte	2
Röhre 1	2
„ 2	2
„ 3	2
„ 4	1
„ 5	0.5
„ 6	0.5
„ 7	1
„ 8	1
„ 9	0
„ 10	0
„ 11—50 <sup>1)</sup>	0

<sup>1)</sup> Bis zu Röhre 35 wurde regelmässig, hernach bis zur Röhre 50 aus jeder zweiten oder dritten abgestrichen.

Röhren zwischen 10 und 15% geschwankt hatte, erfolgte hierauf eine sprunghafte Senkung, indem No 12 und folgende Kulturen überhaupt keine trockene Kolonien mehr zum Vorschein brachten (Tabelle III).

Die auffallende Erscheinung, dass beim fortgesetzten Züchten in Nährflüssigkeit nach längerer oder kürzerer Zeit keine Variantenkolonien mehr auftreten, zeigte sich auch in Kulturen mit dünnen Flüssigkeitsschichten (Kolben). Offenbar übt der Luftsauerstoff keinen merkbaren Einfluss auf diese Erscheinung aus.

Es war nun interessant nachzugehen, ob ein Ausbleiben der Dissoziation in Flüssigkeitskulturen sich auch dann behaupten würde, wenn man die betreffenden Kulturen altern lässt. Hierzu wurde aus willkürlichen Röhren, welche nach 4-tägiger Bebrütung bei 30° C weiterhin bei Zimmer-temperatur aufbewahrt waren, nach bezw. 10, 25, 60 und 72 Tagen auf Platten abgestrichen.



TABELLE III.

Prozentsatz der Variantenkolonien erhalten nach Abstreichen aus einer Reihe von Kulturröhren mit Hefewasser-Glucose; initiale Impfung mit einer Suspension einer R-Kolonie von Saccharosegelatine, worauf eine Suspension eines Tibi-Klumpchens abgestrichen war.

	Prozentsatz trockener Kolonien
Kontrolleplatte	20
Röhre 1	25
„ 2	18
„ 3	15
„ 4	15.5
„ 5	15
„ 6	11.5
„ 7	13.5
„ 8	—
„ 9	7
„ 10	4.5
„ 11	0.5
„ 12	0
„ 13	0
Bis Röhre 16	0

Obwohl sich die Kulturen verschiedentlich verhielten, unterblieb doch im allgemeinen nach ein oder zwei, ja selbst nach drei und vier Wochen das Auftreten trockener Kolonien. Aus noch älteren Kulturen kamen sie jedoch fast immer wieder zum Vorschein und zwar in einer Anzahl, welche zwischen 0.5 und 15% variierte. Fortwährende Überimpfung von Flüssigkeitskulturen, welche man vorher altern lässt, führte mit grosser Sicherheit zum Auftreten der Dissoziation.

Die Beobachtung, dass bei fortgesetzter Kultur in flüssigem Medium unter Vermeidung lange anhaltender Stagnation des Wachstums die Dissoziation ausbleibt, hat offenbar keine allgemeine Gültigkeit. So teilt DESKOWITZ (1937) mit, dass bei einem unstablen R-Typus von *Salmonella aertrycke*, welcher gekennzeichnet war durch ein fortwährendes Abspalten einer konstanten Anzahl (19%) von S-Kolonien auf Platten, der Prozentsatz von Variantenkolonien in Flüssigkeitskulturen bis zu 75% anstieg. Auch andere Forscher erwähnen, dass eine

regelmässige Überimpfung in Flüssigkeitskulturen die Dissoziation fördert und darum wird diese Methode denn auch oft als auslösendes, stimulierendes Agens gebraucht.

Es zeigt sich aber, dass *Betabacterium vermiforme* als Ausnahme auf diese Regel nicht allein steht. So konnte DULANEY (1928) für *Bact. coli communis* feststellen, dass die Dissoziation vollkommen verhindert wurde bei der Züchtung in zuckerhaltigem Medium.

In Übereinstimmung mit DESKOWITZ fand ich, dass die erwähnte Kulturbedingung nicht imstande war die Tendenz zur Unstabilität „dauernd“ zu beeinflussen. Wurde nämlich aus Suspensionen gelatinöser Kolonien, welche aus den reinen Flüssigkeitskulturen herrührten, abgestrichen, dann zeigte sich meistens sogleich wieder der beträchtliche Prozentsatz trockener Kolonien.

Das Unterbleiben der Dissoziation in Flüssigkeitskulturen ohne all zu langer Wachstumsstagnation macht es durchaus annehmlich, dass auch im *Konsortium* keine Dissoziation von *Betabacterium vermiforme* eintritt, eine Ansicht, welche auch durch das Ergebnis des Abstreichens Suspensionen frischer Tibi-Klümpchen gestützt wird. Für die Bakterien im *Konsortium* sind die obengenannten Bedingungen ja doch ohnehin erfüllt. Solange also das *Konsortium* unter Bedingungen lebt, welche eine aktive Vermehrung zulassen, wird sein Fortbestehen als Folge einer a priori denkbaren Entwicklung von nicht-wandstoffbildenden Varianten nicht bedroht werden.

#### § 4. ISOLIERUNG EINER NEUEN, WANDSTOFFBILDENDEN R-VARIANTE.

Wie bereits in § 2 mitgeteilt wurde, zeigt der ursprüngliche, auf Glucoseagar gezüchtete, rauh-körnige R-Typus bei Weiterzüchtung die Neigung um unter Beibehalten des Wandstoffbildungsvermögens ungefähr gleich grosse, glattere und auch grössere, platte Kolonien zur Entwicklung zu bringen. Eine nähere Untersuchung lehrte, dass diese Kolonieformen sehr labil sind und der einzige direkt feststellbare Unterschied mit dem R-Typus in der Form und dem Aussehen der Kolonie liegt.

Bei weiterer Untersuchung des Verhaltens des ursprünglichen R-Typus hat sich herausgestellt, dass ebenfalls die Möglichkeit zu einer viel deutlicheren Dissoziation unter Beibehalten des Wandstoffbildungsvermögens besteht. Durch Abstreichen aus zwei Monate alter Glucose-Hefewasserkulturen, geimpft mit einer Kolonie des ursprünglichen R-Typus, konnte ich, allerdings selten, auf den Glucoseagarplatten neben

normalen R- und meistens vielen platten, nicht-wandstoffbildenden O-Kolonien, einzelne auffällig rauhe Kolonien auffinden. Diese ungefähr mit derjenigen des R-Typus gleich grosse Kolonie unterschied sich von dieser deutlich durch seine viel rauhere — mehr faltig-rauhe als körnig-rauhe — Oberfläche. Beim Abstreichen dieses Koloniematerials auf Saccharosegelatine zeigte sich, dass die Zellen ihr Wandstoffbildungsvermögen beibehalten hatten. Die in durchfallendem Licht schimmerenden Kolonien dieses künftighin als R' bezeichneten Typus, waren plattlinsenförmig (1.5—2.5 mm) und hatten einen unregelmässig gewellten Rand (Abb. 21). Das Muster der Kolonie zeigte im Gegensatz zu R eine Struktur in verschiedenen Richtungen verlaufender, gewellter Stränge.

Auch in der Zellmorphologie bestand zwischen R' und R ein grosser, konstanter Unterschied. Die für R' charakteristischen Zelltypen waren beträchtlich länger als bei R (Seite 142).

Unterschiede in biochemischer Hinsicht (Wandstoffbildung, Zuckervergärung, etc.) konnten jedoch nicht festgestellt werden. Wird R' auf Saccharosegelatine gezüchtet, dann zeigen sich die gelatinösen Kolonien aus überwiegend langgestreckten, groben Kapseln aufgebaut. Diese Kapseln verdanken ihre langgestreckte Form an die Anwesenheit langer und fadenförmiger, gerader, gekrümmter oder schlängelnder Zellen.

Hinsichtlich der Ausgangsform R verhielt sich R' insofern als ein konstanter und selbständiger Typus, als ich nicht imstande war eine Reversion R' → R zu beobachten.

Inzwischen konnte aber dieser R'-Typus gleich wie R als mehr oder weniger „unstabil“ bezeichnet werden hinsichtlich der Abspaltung neuer Kolonievarianten, deren Wandstoffbildungsvermögen verloren gegangen war. Bei Weiterzüchtung auf Glucoseagar fand in den R'-Kolonien frequent eine Dissoziation statt. Dies zeigte sich meist in Form eines dünnen marginalen Auswuchses. Die in wechselnder Anzahl auftretenden, als O'-bezeichneten Variantenkolonien waren gross (bis zu 1 cm), platt und dünn (Abb. 21).

Obwohl das Plattenbild dieser Kulturen auf den ersten Anblick sehr viel Übereinstimmung mit jenem, durch Aussäung von R-Kolonien erhaltenen Bild aufwies, zeigte sich bei näherer Betrachtung doch sehr deutlich ein Unterschied nicht nur zwischen R' und R aber auch zwischen O' und O.

Im Gegensatz zu O besass der platte O'-Typus ein breitliniges Muster, in welchem oft, vor allem im Zentrum, eine Andeutung gewellter Stränge auffiel. Auch waren die für O' charakteristischen Zelltypen





Abb. 21

Eine R'-Kolonie (oben) mit seiner Struktur von gewellten Strängen und eine plakatartige, sehr dünne O'-Kolonie. Vergrößerung 20 $\times$ .

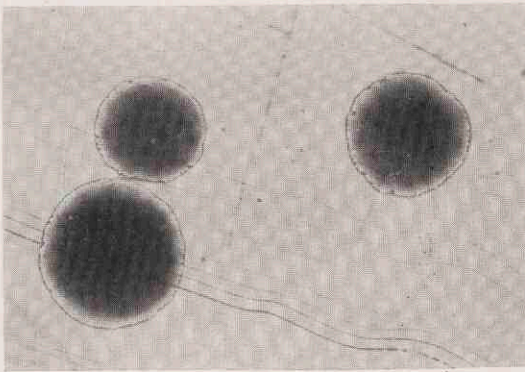


Abb. 22.

S-Kolonien, wie sie bei Weiterzüchtung vom R-Typus bzw. O-Typus auf Hefewasser-2% Glucoseagarplatten zum Vorschein kommen können. Vergrößerung 20 $\times$ .

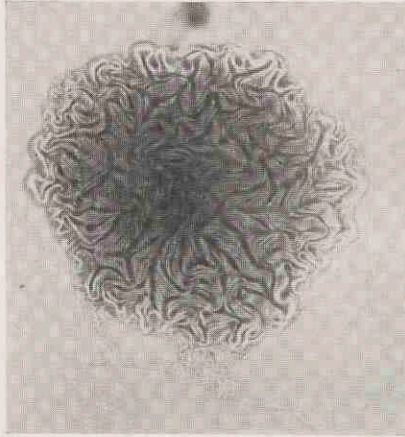


Abb. 23.

$R_E$ -Kolonie mit seiner ausgesprochenen Struktur von gewellten Strängen.  
Vergrößerung  $20\times$ .

um vieles länger als bei O, aber meist doch kürzer als bei R'. Beiden Formen, O' und O, fehlt jedoch die Fähigkeit zur Wandstoffbildung.

Bei Weiterzüchtung des R'-Typus stellte sich heraus, dass, selbst einige Zeit hindurch, der O'-Typus völlig fehlen konnte, doch waren auch auf diesen scheinbar reinen R'-Platten dem R' gleich grosse Variantenkolonien mit einer nur wenig rauhen, manchmal fast glatten Oberfläche vorhanden. Auch sie zeichneten sich, ebenso wie O', durch den Verlust des Wandstoffbildungsvermögens aus. In seinem Muster unterschied sich die Kolonie von R' durch das Vorkommen von breiten Linien anstatt gewellter Strängen.

Von dieser S' benannten Kolonievariante, welche auch in Subkulturen des O'-Typus auftrat, waren die charakteristischen Zelltypen kürzer als bei R' (Seite 142).

S' und O' ergaben in Übereinstimmung mit den aus R entstandenen S- und O-Formen, bei Weiterzüchtung meistens Mischplatten.

Es sei hier bemerkt, dass in Plattenkulturen von S' ein einziges Mal eine reine, völlig glatte und ganzrandige S-Kolonie aufgetreten ist.

Später werde ich noch eine dergleiche S'-artige Kolonie mit demselben Aussehen und ebenfalls ohne Wandstoffbildungsvermögen, welche aus einer sehr rauhen aber nichtwandstoffbildenden Variante (R<sub>E</sub>) entstanden ist, erwähnen.

##### § 5. NÄHERE BEOBACHTUNGEN ÜBER DIE IN PLATTENKULTUREN REGELMÄSSIG AUFTRETENDEN, NICHT-WANDSTOFFBILDENDEN O- UND S-VARIANTEN.

Wie in § 2 beschrieben wurde, kommt bei Weiterzüchtung der im Konsortium ursprünglich vorhandenen Form von *Betabacterium vermiforme* auf Glucoseagar infolge einer Dissoziation fast immer eine O- und weniger frequent eine S-Kolonieform zur Entwicklung.

Der von mir als O bezeichnete Typus kennzeichnet sich durch die Bildung grosser (bis 1 cm), platter und fein-gefalteter, sehr dünner Kolonien, oft von einem glatten, dickeren Knopf versehen. Der reine S-Typus ist viel kleiner (1—1.5 mm), rund bis einigermaßen unregelmässig in seiner Form, mit einer völlig glatten und feuchtglänzenden Oberfläche und einem glatten bis leicht gezackten Rand (Abb. 22).

Obwohl den beiden Kolonievarianten das Wandstoffbildungsvermögen aus Saccharose fehlt, zeigten sich in biochemischer Hinsicht mit dem ursprünglichen R-Typus keine weitere Unterschiede, wohl aber hinsichtlich der Zellmorphologie (§ 7).



Wird der platte O-Typus auf Glucoseagar weitergezüchtet, dann kommen auf den betreffenden Platten oft ausschliesslich grosse, platte Kolonien zur Entwicklung; auf stark geimpften Stellen sind diese Kolonien unter Bewahrung ihrer individuellen Grenzen meist zu einem grossen, dünnen Plakat vereinigt.

In Subkulturen von diesem Typus treten jedoch regelmässig Mischplatten auf, auf welchen neben den überwiegenden O-Kolonien hier und da kleine, gewölbte S-Kolonien vorhanden sind. Nicht selten zeigen einzelne S-Kolonietypen an ihrem Rand oder an Teilen des Randes eine mehr oder weniger breite, dünne O-Zone. Solche Kolonien bilden eigentlich eine ununterbrochene Formenreihe, welche schliesslich in die O-Kolonie mit knopfförmigen Zentrum und nicht zu breiter Randzone übergeht.

Geht man bei diesen Mischplatten von der am meisten reinen S-Kolonie aus, dann ergeben die Subkulturen, ebenso wie dies bei O der Fall ist, nahezu immer wieder Mischplatten mit reinen, runden, glatten S-Formen, welche ganz oder teilweise von einem dünnen Rand umgeben sind, und grossen, ausgesprochenen O-Formen.

Hieraus lässt sich schliessen, dass die O- und S-Kolonietypen einander sehr nahe stehen. In Übereinstimmung hiermit lehrte eine mikroskopische Untersuchung, auf die wir noch später (Seite 142-143) zurückkommen, dass in der Zellmorphologie keine Unterschiede aufzufinden waren. Meine Versuche um aus S-Kolonien, welche von O-Platten stammten, durch regelmässige Weiterzüchtung einen reinen, einigermaßen stabilen S-Typus zu erhalten, scheiterten.

Da sich bei der Züchtung des R-Typus auf Glucoseagar ab und zu auch S-Kolonien einfanden, beschloss ich auch diese auf ihre Stabilität zu prüfen. Nach einigen vergeblichen Versuchen mit verschiedenen, rein aussehenden S-Kolonien, glückte es mir schliesslich eine S-Kolonie zu isolieren, welche bei Weiterzüchtung sogleich ein vollkommen einheitliches Plattenbild reiner S-Kolonien ergab (Abb. 22).

Auch bei fortgesetzter Kultur erwies sich dieser S-Typus konstant; echte O-Kolonien und S-Kolonien mit O-artigen Rändern kamen in diesen Kulturen nur spärlich vor. Wenn die Kulturen jedoch lange in Schrägkulturen aufbewahrt wurden, trat abermals Dissoziation ein.

Der isolierte S-Typus kann also „relativ stabil“ genannt werden.

Eine weitere Untersuchung nach dem Verhalten dieses S-Stammes lehrte, dass mehrere Passagen von 1—2 Monate alten Kulturen (Hefewasser-Glucose) die Stabilität ungünstig beeinflussten. Bei der Aussäus

solcher Kulturen kamen unreine S-Kolonien, zuweilen Formen mit einigermaßen rauher Oberfläche und platte O-Kolonien zur Entwicklung.

Einige Male konnte ich auf diesen Platten nur einzelne Kolonien eines neuen, ausgesprochen rauhen Typus beobachten. Dieser als  $R_E$  bezeichnete rauhe Typus wird in § 6 näher beschrieben.

Immer zeigte sich, dass allen als O und S aufgetretenen und beschriebenen Typen, welche auf direktem oder indirektem Weg von dem R-Typus herrührten, das Wandstoffbildungsvermögen abging.

Um eine event. Rückkehr dieser Eigenschaft zu induzieren, bediente ich mich der folgenden Kulturmethoden: 10—15-maliges Überimpfen in Saccharose-Hefewasser und zwar unter normalen Bedingungen (in Röhren und in kleinen Kolben), in Kohlensäureatmosphäre, unter gleichzeitiger Impfung mit *Saccharomyces intermedius* und ferner bei Anwesenheit einer bestimmten Menge von bei 70° C abgetöteter Zellen des R-Typus<sup>1)</sup>.

Obwohl ich die Rückkehr des einmal verloren gegangenen Dextranbildungsvermögens, niemals beobachten konnte, ist es doch nicht ausgeschlossen, dass das Merkmal einmal unter irgendeiner Bedingung zum Vorschein kommen kann.

Es sei hier im Zusammenhang mit dem von mir bei *Betabacterium vermiforme* beobachteten Abspalten von Varianten, welche die Eigenschaft der Dextranbildung verloren haben, auf eine Veröffentlichung von KAGAN und NEPOMNIASCHAIA (1936) hingewiesen. Die beiden russischen Forscher berichten über eine Dissoziationserscheinung bei *Leuconostoc mesenteroides* (*Betacoccus arabinosaceus*); koloniemorphologische Veränderungen sollten verknüpft sein mit Abweichungen des Dextranbildungsvermögens. Sie konnten drei Kolonietypen, nämlich R-, O- und S-Kolonien isolieren. In saccharosehaltigen Nährmedien soll der R-Typus durch eingekapselte Individuen gekennzeichnet sein, welche eine schleimige, froschlauchähnliche Masse bilden, der O-Typus durch nackte Diplokokken, welche in einer egal-gelatinösen Substanz eingebettet sind,

<sup>1)</sup> Zur Anwendung der letztgenannten Methode wurde ich geführt durch die Beobachtung GRIFFITH's, der Zellen von avirulenten Pneumokokken zusammen mit vorher durch Erhitzen abgetöteten, virulenten Zellen verschiedener Typen von *Pneumococcus* in Mäuse impfte und auf diese Weise die avirulente Ausgangsform in die verschiedenen virulenten Typen überführen konnte. REIMANN (1925, 1929) brachte mit dieser Methode völlig irreversible, avirulente Varianten von *Pneumococcus*-Stämmen zur Reversion.

Das Fehlschlagen meines Versuches macht es wahrscheinlich, dass bei dieser Methode die Mitarbeit der Zellen des Versuchstieres eine wesentliche Bedingung ist.



während der S-Typus zusammengesetzt ist aus nackten Diplokokken, welche ihr Schleimbildungsvermögen verloren haben.

In Teil I wurde dargetan, dass *Leuconostoc mesenterioides* und *Betabacterium vermiforme* in biochemischer Hinsicht sehr nah verwandte Bakterienarten sind, und es ist daher sehr auffallend, dass auch bei *Leuconostoc* durch Dissoziation nichtwandstoffbildende Varianten auftreten können.

In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass SACCHETTI (1936) in seiner schon zitierten Abhandlung berichtet, dass alle seine Stämme von *Leuconostoc mesenterioides* das Dextranbildungsvermögen aus Saccharose ziemlich rasch verloren; auch wenn er sie unter den verschiedensten Bedingungen züchtete, konnten die Stämme nicht wieder zur Dextranbildung gebracht werden.

Hinsichtlich der Resultaten der obengenannten Forscher sei mitgeteilt, dass sich beim Abstreichen von Suspensionen der im Laboratorium für Mikrobiologie seit Jahren vorhandenen Stämme von *Leuconostoc mesenterioides* auch eine unverkennbare Dissoziation zeigte.

Die Saccharosegelatineplatten wiesen zwei grundverschiedene Kolonietypen auf:

1. grössere und kleinere Tropfenkolonien von dünnschleimiger Konsistenz mit nackten Kokken, worin bei Lupe-Vergrößerung sehr deutlich lokale Anhäufungen von stark eingekapselten Individuen vorhanden sind.

2. Feste, klümpchenförmige Kolonien von einer gelatinösen Beschaffenheit, welche aus Zusammenballungen von sehr dicken Kapseln bestehen. Hier und da trifft man auch kleine Kolonien an, welche beim ersten Anblick trocken erscheinen könnten. Die mikroskopische Beobachtung lehrt aber, dass auch hier vorherrschend Kapselkonglomerate mit daneben nackten Individuen vorhanden sind.

Alles in allem kann also geschlossen werden, dass unbedingt von einer Dissoziation, wobei einerseits eingekapselte, andererseits nichteingekapselte jedoch ebenfalls dextranbildende Zellen auftreten, die Rede ist; diese Erscheinung ist schon von SMIT (1919) ans Licht gebracht. Dagegen fehlt aber bei den untersuchten Stämmen jegliche Andeutung, dass die Dissoziation in eine Form resultiert, welche das Dextranbildungsvermögen verloren hat.

#### § 6. EINE AUS DEM S-TYPUS ERHALTENE, NICHT-DEXTRANBILDENDE, RAUHE VARIANTE.

Im vorigen Paragraphen ist schon erwähnt, dass aus dem relativ stabilen S-Stamm unter gewissen Bedingungen eine neue Variante erhalten wurde.



Nachdem diese Form einige Male hintereinander eine alte Kultur passiert hatte, entstanden beim Abstreichen aus einer 2—3 Monate alten Flüssigkeitskultur nicht selten ausser S-Kolonien von runder oder etwas unregelmässiger Form und einer Anzahl platter O-Typen, einige Kolonien eines sehr rauhen (faltig-rauhen) Typus. Bei Weiterzüchtung zeigte sich, dass es eine neue Variante war, welche sich durch platt-linsenförmige Kolonien von 2—3 mm Grösse mit einer trocken-glänzenden Oberfläche und welligem Rand auszeichnete (Abb. 23).

Das Muster der Kolonie zeigte eine Übereinstimmung mit dem des R'-Typus; doch war die Strängenstruktur hier noch etwas mehr ausgesprochen. Der Rand zeigte im Gegensatz zu R', meist einen faserigen Bau mit langen heraussteckenden, gewellten und gekräuselten Fäden.

Dieser grobe, als R<sub>E</sub> (R extrem) bezeichnete, Typus erinnert an den Medusa-Kolonietypus und zeigte sich bei Weiterzüchtung sogleich recht gut konstant. (Vergl. ARKWRIGHT, 1930; SOULE, 1927 und NUNGESTER, 1929). Von einer Reversion → S war bei der Plattenkultur nichts zu bemerken. Gleich dem Ausgangs-S-Stamm konnte auch dieser relativ stabile R<sub>E</sub>-Typus keinen Wandstoff aus Saccharose bilden, während sonst nennenswerte Unterschiede in biochemischer Hinsicht fehlten. Eine Untersuchung nach der Stabilität lehrte uns, dass dieser R<sub>E</sub>-Stamm noch beträchtlich stabiler war als der S-Stamm. Sogar nach der Passage einiger 1—2 Monate alten Hefewasser-Glucose- und Agarschräggkulturen blieb R<sub>E</sub> bei der Aussäung völlig konstant.

Aus einer dritten Flüssigkeitskultur konnte jedoch beim Abstreichen nach 4—5 Monaten eine Platte erzielt werden, auf welcher neben dem ursprünglichen Typus in überwiegender Anzahl eine neue Variante vorkam. Die Oberfläche dieser Kolonien war nur in geringem Masse rau, manchmal fast glatt. Diese S-artige Form (im Schema als A bezeichnet) besass dasselbe Koloniemuster — mit groben, breiten Linien ohne Strängenstruktur — als der S'-Typus. Die mikroskopische Untersuchung zeigte, dass einerseits die langen Fäden der R<sub>E</sub>-Form fehlten, andererseits aber die mittlere Länge der Zellen um vieles grösser war als die des S-Typus.

Die neu aufgetretene, nahezu glatte Form werden wir als eine „partielle“ Reversion von R<sub>E</sub> → S auffassen müssen. Es glückte mir nicht bei diesem R<sub>E</sub>-Stamm eine vollständige Reversion → S zu bewerkstelligen.

Noch sei mitgeteilt, dass aus einer Kultur der S-Form in Hefewasser-2% Glucose beim Abstreichen auf Glucoseagar eine Kolonie auftrat, die im Aussehen sowohl als im Muster vom erstgenannten R<sub>E</sub>-Typus sich nicht

unterschied. Nur die Länge der vorherrschenden Zelltypen war geringer. Es handelte sich hier um kürzere Fäden und verlängerte Stäbchen. In zellmorphologischer Hinsicht könnte man hier also von einer „nicht extremen“ Form sprechen.

Es zeigte sich nun, dass nach einer Reihe 14-tägiger Überimpfungen dieses, als  $R^{\circ}_E$  bezeichneten Typus, in Hefewasser-2% Glucose beim Abstreichen auf Platten drei verschiedene Koloniearten erhalten wurden:

1. Der normale  $R^{\circ}_E$ -Typus.

2. Kleine (1 mm grosse), runde, gewölbte S-Kolonien mit einer feucht-glänzenden, völlig glatten Oberfläche. Sie stimmten in ihrem Aussehen und im Koloniemuster vollkommen mit dem ursprünglichen S-Typus überein.

Das Zellbild war insofern etwas anders, als bei dieser neuen Form viele, für den S-Typus noch ein wenig zu lange Zellen vorkamen; sie verkehrten jedoch alle in einem geförderten Septierungs- bzw. Ablösungsstadium. Mit Vernachlässigung dieses bloss kleinen Unterschiedes, dürfen wir wohl feststellen, dass bei diesem  $R^{\circ}_E$ -Typus eine praktisch völlige Reversion zustande gekommen ist.

3. In geringem Masse rauhe (bisweilen fast glatte) Kolonien mit einem breitlinigen Muster ohne gewellte Strängestruktur. Diese S-artigen Kolonien bestanden aus überwiegend langen Stäbchen und ähnelten jenem Typus, den wir bereits bei der partiellen Reversion des erstgenannten  $R_E$ -Stammes beschrieben.

Wir sehen also, dass bei der „nicht extremen“  $R_E$ -Form nicht nur eine beinahe vollständige Reversion aufgetreten ist, sondern dass gleichzeitig auch ein intermediärer Kolonietypus isoliert wurde.

Es sei noch bemerkt, dass nicht nur  $R_E$  und S, sondern auch alle hieraus erhaltenen Formen kein Wandstoffbildungsvermögen aufwiesen. Ebenso wenig wie bei S und O konnte ich auch bei  $R_E$  trotz der Anwendung der unter § 5 genannten Induzierungsmethoden, eine Rückkehr dieser Eigenschaft nicht erzielen.

Mit Ausnahme des fehlenden Wandstoffbildungsvermögens zeigten die Varianten keine anderen nennenswerten biochemischen Unterschiede. Alle Varianten bildeten aus Glucose Gas und Säure, aus Fructose Mannit, verursachten in Milch keine Koagulation und waren Gram-positiv und katalase-negativ. Für die vier wichtigsten Typen habe ich die Vergärung von verschiedenen Zuckerarten (Zuckeralkoholen und Glucosiden) sowohl qualitativ wie auch quantitativ untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV zusammengefasst.

TABELLE IV.

Säurebildung in  $\text{cm}^3$  Normalsäure pro  $100 \text{ cm}^3$  Kulturflüssigkeit aus verschiedenen Zuckerarten (Zuckeralkoholen und Glucosiden) durch die Varianten: R, R', R<sub>E</sub> und S.

Substrat:	R	R'	R <sub>E</sub>	S
Glucose	9.5	9.6	8.7	9.6
Maltose	8.6	8.5	8.3	8.8
Dextrin	—	—	—	—
Stärke (lösl.)	—	—	—	—
Insulin	—	—	—	—
Fructose	8.2	7.5	8.7	8.1
Saccharose	5.0	5.1	7.9	9.1
Galactose	9.6	9.6	9.3	9.7
Lactose	1.5	4.0	3.5	3.2
Mannose	—	—	—	—
Arabinose	21.9	21.5	21.1	19.5
Mannit	—	—	—	—
Glycerin	—	—	—	—
Salicin	1.3	?	—	1.5
Xylose	21.5	21.1	22.0	21.8

Aus dieser Tabelle geht hervor, dass die vier untersuchten Stämme sich in qualitativer Hinsicht völlig gleich verhielten. In quantitativer Hinsicht sind die Schwankungen auch ganz unbedeutend und überschreiten sie nicht die Grenzen der Genauigkeit der angewandten Methode. Nur ist begreiflicherweise die Säurebildung im Saccharosemedium bei den beiden wandstoffbildenden Varianten R und R' merkbar geringer als bei den zwei übrigen untersuchten Formen.

#### § 7. DER ZUSAMMENHANG ZWISCHEN KOLONIE- UND ZELLMORPHOLOGIE BEI DEN AUFGETRETENEN VARIANTEN.

Bevor ich die von mir beobachteten Varianten auf Grund ihrer morphologischen und biochemischen Merkmale in ein Schema zusammenfasse, sei von den wichtigsten Varianten eine zusammenfassende morphologische Charakteristik der Zellen gegeben.

Im Verlaufe der Untersuchung wurden die Kolonien verschiedentlich mikroskopisch untersucht. Hierbei sammelte ich in erster Linie Angaben hinsichtlich der Abmessungen der längsten und der kürzesten, im Präparat



anwesenden Zellen. Vor allem habe ich mich bemüht um die Abmessungen der als „vorherrschend“ zu betrachtenden Zelltypen der Kolonien festzustellen. Es zeigte sich, dass dieses für jeden Variantentypus charakteristische Messgebiet der einzelnen Zellen 3—6 Tage alter Kolonien auf Glucoseagarplatten nahezu konstant war und als „zellmorphologisches Charakteristikum“ der betreffenden Varianten verwendet werden konnte.

#### *Ursprünglicher R-Typus.*

Rauh-körnige Kolonie mit unregelmässig gewelltem Rand; das Muster mit ziemlich schmalen Linien und ohne Strängestruktur; das Vermögen zur Wandstoffbildung ist vorhanden.

Mikroskopisches Bild: vorherrschend einzelne, kurze, gerade Stäbchen, manchmal auch zu zweien, bisweilen kurze Ketten vorhanden. Ausserdem fehlen selten beträchtlich längere Stäbchen, welche manchmal fadenförmig und dann gekrümmt und gebogen sein können.

Die wechselnde Anzahl dieser ist im Vergleich mit den geraden, kurzen Individuen auffallend gering. In den Zellen, selbst in jungem Zustand, zeigen sich nicht selten nach der Färbung mit Methylenblau dunkel gefärbte Granula. Im Präparat einer alten Schrägagarkultur wird ausserdem eine grosse Zahl freier Granula zwischen Zelldetritus und noch intakten Zellen beobachtet. Ein solches mikroskopisches Bild findet man im Prinzip bei allen Varianten wieder, ist also keineswegs spezifisch für R.

Das zellmorphologische Charakteristikum für R erstreckt sich von:  $(2.5-6) \times (0.8-1.2) \mu$ ; die extremen Abmessungen der einzelnen Individuen sind: 1.75 — bisweilen 30  $\mu$ .

#### *R'-Typus.*

Grobkörnig- oder faltig-rauhe Kolonie mit unregelmässig gewelltem Rand; das Muster ist aus wellig verlaufenden Strängen aufgebaut; Vermögen zur Wandstoffbildung ist vorhanden.

Mikroskopisches Bild: vorherrschend einzelne, mässig-lange, lange und fadenförmige, event. mit Granula versehene Zellen, manchmal auch zu zweien; nicht selten zeigt sich eine Kombination von einem langen mit einem kurzen Individuum.

Neben kürzeren und längeren, unseptierten Fäden kommen einerseits solche vor mit einer sehr undeutlichen Septierung, andererseits Individuen, augenscheinlich aus einigen langen Gliedern zusammengesetzt, welche oft mit kleinen kokkenartigen Elementen abwechseln.

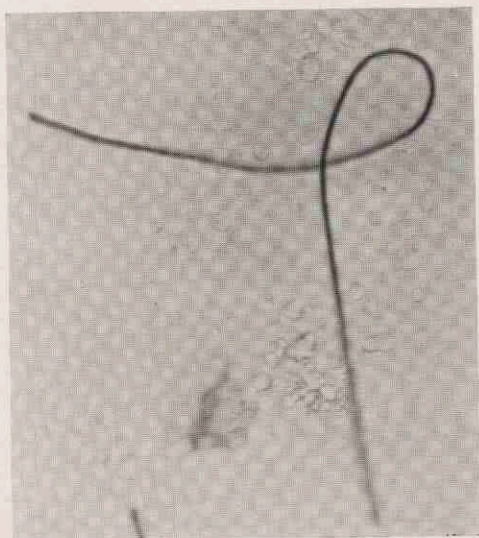


Abb. 24.

Schlingenförmiger, unseptierter Faden des R<sub>E</sub>-Typus. Vergrößerung 1200×.



Abb. 25.

Kurze Stäbchen des S-Typus, meistens einzeln oder zu zweien. Vergrößerung 1200×.

Das zellmorphologische Charakteristikum für R' bewegt sich zwischen:  $(5 - 20) \times (0.8 - 1.2) \mu$ ; die extremen Abmessungen der einzelnen (unseptierten) Individuen betragen: 1.75 — bisweilen 60  $\mu$ .

#### *R<sub>E</sub>-Typus.*

Faltig-rauhe Kolonie mit unregelmässigem Rand; das Muster ist aus wellig verlaufenden Strängen aufgebaut; die Strängestruktur ist hier noch stärker entwickelt als bei R'. Das Vermögen zur Wandstoffbildung fehlt.

Mikroskopisches Bild: vorherrschend unseptierte Fäden und sehr lange Stäbchen, welche oft Granula enthalten (Abb. 24). Die Zahl gebogener, schlängelnder oder schlingenförmiger Fäden ist auffallend gross; die längsten Fäden bestehen zuweilen aus zwei oder drei Stücken; hier und da bemerkt man Fäden, welche degenerieren (lysierten), d.h. der Faden zeigt an einigen Stellen eine Unterbrechung in Form einer Reihe aufeinanderfolgender kokkenartigen Elemente; zugleich weist er oft unregelmässig geschwollenen Teilstrecken auf, welche nur durch äusserst dünne Fädchen miteinander zusammenhängen. Trotz des fadenförmigen Charakters von R<sub>E</sub> fehlen doch niemals, allerdings nur spärlich, kurze Zellen.

Das zellmorphologische Charakteristikum für R<sub>E</sub> erstreckt sich von:  $(10 - 50) \times (0.8 - 1.2) \mu$ ; die extremen Abmessungen der unseptierten Individuen betragen: 2.5 — bisweilen 125  $\mu$ .

#### *S-Typus.*

Feuchtglänzende, glatte Kolonie, rund oder einigermaßen unregelmässig geformt; Rand glatt oder etwas zackig; Vermögen zur Wandstoffbildung fehlt.

Mikroskopisches Bild: sehr kurze, gerade Stäbchen, einzeln oder zu zweien, oft auch in Ketten (Abb. 25). Manchmal kommen einige längere und dickere (1.3—1.5  $\mu$ ) Zellen vor; zu zweien und in Kettenform sind die Elemente kokkenartig; es können Granula in den Zellen vorkommen.

Das zellmorphologische Charakteristikum für S erstreckt sich von:  $(1.75 - 3.5) \times (0.8 - 1.2) \mu$ ; die extremen Abmessungen betragen: 1 — bisweilen 15  $\mu$ .

#### *O-Typus.*

Der platte, dünne, nicht-wandstoffbildende O-Typus stimmt in zellmorphologischer Hinsicht mit dem S-Typus völlig überein.



*S'*-Typus.

Einigermassen rauhe, meist fast glatte Kolonie, rund oder ein wenig unregelmässig geformt; Rand leicht gewellt bis glatt; Vermögen zur Wandstoffbildung fehlt.

Mikroskopisches Bild: vorherrschend mässig-lange Stäbchen, einzeln oder zu zweien und in Ketten; bei den längeren Individuen zeigt sich oft eine undeutliche Septierung.

Das zellmorphologische Charakteristikum für *S'* erstreckt sich von:  $(3.5 - 12) \times (0.8 - 1.2) \mu$ ; die extremen Abmessungen sind: 1.75 — bisweilen 25  $\mu$ .

*O'*-Typus.

Der platte, dünne, nicht-wandstoffbildende *O'*-Typus stimmt in zellmorphologischer Hinsicht mit dem *S'*-Typus völlig überein.

## § 8. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE.

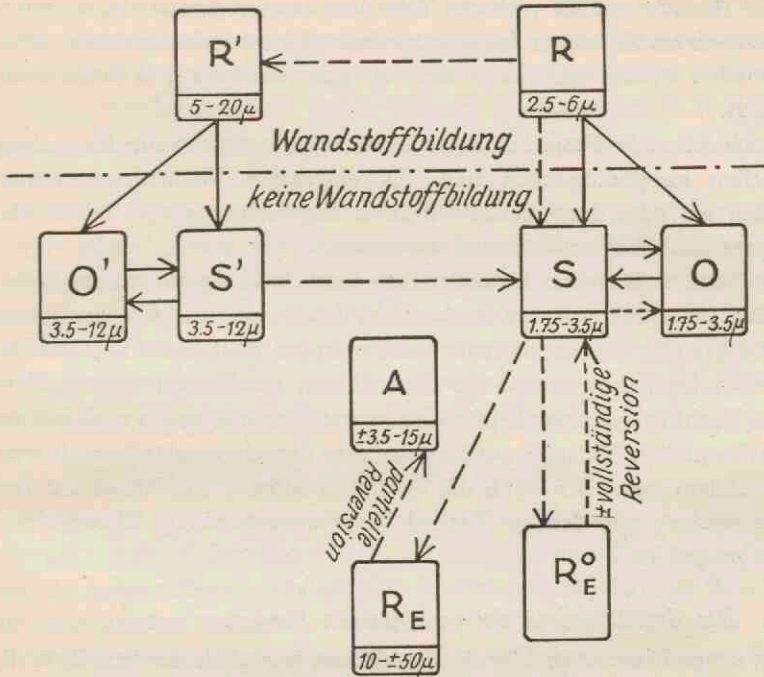
Die in den vorhergehenden Paragraphen mitgeteilten Resultate zeigen, dass *Betabacterium vermiforme* mehreren Dissoziationsvorgängen unterliegt, wobei Formen mit wesentlich verschiedenen Merkmalen entstehen.

Zur Erleichterung der Übersicht folgt hier an erster Stelle ein Schema, in welchem die aufgetretenen Varianten und ihre gegenseitige Verhältnisse zusammengefasst sind.

Zu diesem Schema sei das Folgende bemerkt.

Die Varianten oberhalb der punktierten Linie, zeichnen sich durch den Besitz des Vermögens zur Wandstoffbildung aus, während den unter dieser Linie gelegenen Varianten diese typische physiologische Eigenschaft fehlt. Mit gestrichelten Pfeilen sind Übergänge wiedergegeben, bei welchen die betreffenden Varianten nur infrequent und meist in sehr geringer Zahl aufgetreten sind; die gezogenen Pfeile beziehen sich auf mehr oder weniger häufig vorkommende Übergänge. Der Unterschied zwischen den Vertretern des  $R_E$ -Typus wird durch die Lage auf verschiedener Höhe zum Ausdruck gebracht. Die als A bezeichnete Variante, welche bei der partiellen Reversion des am meisten ausgesprochenen  $R_E$ -Typus entstand, entsprach in vielen Hinsichten der *S'*-Variante.

Es versteht sich, dass das hier aufgestellte Schema durchaus nicht das gesammte Variabilitätsgebiet von *Betabacterium vermiforme* wiederzugeben braucht. Es ist vollauf denkbar, dass bei fortgesetzter Untersuchung noch neue Varianten, neue Übergänge oder andere Stabilitätsgrade



aufzutreten können. Mit Hinsicht auf das Vermögen aus Saccharose Wandstoff bzw. Kapseln zu bilden, erscheint es nicht wahrscheinlich, dass wir bei *Betabacterium vermiforme* auch noch charakteristische M-Varianten im Sinne HADLEY's beobachten werden können, d.h. also Formen, deren Zellen unabhängig vom Fehlen oder Vorhandensein von Saccharose in den Nährböden doch Kapseln bzw. einen dünnen Schleim bilden. Trotzdem will ich die Möglichkeit, dass auch noch M- oder G-Typen aufzutreten vermögen, nicht gänzlich ausschliessen.

Bei der jetzt folgenden Besprechung der Ergebnisse scheint es wünschenswert spezielle Aufmerksamkeit zu schenken an diejenigen Punkte, welche, wie in Kapitel X, § 3 hervorgehoben ist, für unsere Einsicht in das Wesen der Dissoziationserscheinung von mehr spezieller Bedeutung sind.

Hinsichtlich der von VAN LOGHEM gegebenen Einteilung der Variabilitätstypen war es unumgänglich eine Einteilung der angetroffenen Varianten in „stabile, relativ stabile“ und „labile“ vorzunehmen.

Für die aufgefundenen „relativ stabilen“ Formen muss weiter dann festgestellt werden, ob diese eine Reversibilität, d.h. einen Rückschlag zur Ausgangsform, aufweisen.

Mit Hinsicht auf die zyklische Theorie scheint es gewünscht zu untersuchen, ob im Auftreten der verschiedenen Formen ein „gerichtet sein“ vorhanden ist, oder dass es sich dabei um ganze oder teilweise Reversionen handelt.

Auch soll an die Frage herangetreten werden, inwieweit eine Koppelung zwischen morphologischen und physiologischen Veränderungen vorhanden ist, oder dass die betreffenden Eigenschaften eine mehr oder weniger unabhängige Variation aufweisen.

Schliesslich könnte es für eine tiefere Einsicht in das Wesen der Dissoziation förderlich sein zu analysieren, inwieweit aus den gemachten Beobachtungen zu einem mehr oder weniger deutlichen Einfluss der äusseren Bedingungen auf die Dissoziation geschlossen werden darf.

Im Nachfolgenden werde ich nun allererst eine Analyse des vorhandenen experimentellen Materials auf die genannten Gesichtspunkte durchführen.

Nachdem werde ich dann die hierbei erhaltenen Ergebnisse auf ihre Vereinbarkeit mit den in Kapitel X hervorgehobenen Dissoziations-theorien prüfen.

#### a. *Der Stabilitätsgrad der verschiedenen Formen.*

In erster Linie seien hier die Ergebnisse bezüglich der Stabilität der beobachteten Varianten zusammengestellt. Wir müssen dann zunächst feststellen, dass im absoluten Sinne stabile Varianten nicht angetroffen worden sind; es gelang nach Anwendung bestimmter Kulturmethoden fortwährend Varianten mit abweichenden Eigenschaften zu erhalten.

Inzwischen können wir die aufgetretenen Varianten in zwei Gruppen einteilen, nämlich in Typen, welche bei der Züchtung auf allen in dieser Untersuchung verwendeten festen Nährböden frequent dissoziieren, die sog. unstabilen Formen (Siehe § 2 und § 4) und in Typen, welche auf diesen Platten überhaupt nicht oder infrequent — und dann nur einzelne — Variantenkolonien zur Entwicklung bringen, die relativ stabilen Typen (siehe § 5 und § 6).

Als *unstabile* Typen sind R und R' zu betrachten. Diese beiden durch das Vermögen zur Wandstoffbildung gekennzeichneten Typen dissoziieren frequent, wobei die entstehenden Varianten sich nicht allein in der Kolonie- und Zellmorphologie, sondern auch durch den Verlust des Wandstoffbildungsvermögens von den anderen Formen unterscheiden. Ausser den R- und R'-Typen zeigten auch die O- und S- und O'- und S'-Typen fast immer einen unstabilen Charakter, insofern, als bei Weiterzüchtung in der Regel Mischplatten erhalten wurden.



Diejenigen Typen, welche sich während der Untersuchung als *relativ stabile* Varianten erwiesen, entstanden vereinzelt und zwar hauptsächlich durch altern lassen von Flüssigkeitskulturen. Eine Ausnahme bildete der S-Typus, welcher als relativ stabile Variante zufällig von einer R-Kulturplatte isoliert werden könnte; auch der S'-Typus ist von Platten (R'-Platten) isoliert worden.

Von der  $R_E$ -Variante wurde ein extremer und ein nicht extremer Typus isoliert; beide unterscheiden sich auch durch den Grad ihrer Stabilität. Sie sind jedoch beide zu den relativ stabilen Varianten zu rechnen. Der Stabilitätsunterschied kennzeichnete sich durch die grössere Leichtigkeit mit der der nicht extreme Stamm zur Reversion gebracht werden konnte. Bei ihm war die Reversion praktisch vollständig, während sie bei dem extremen Stamm nur teilweise war (§ 6).

#### b. Die Reversibilität der eingetretenen Variationen.

Angesichts der Tatsache, dass eine absolute Stabilität der erhaltenen Varianten nicht angetroffen wurde, müssen wir nun untersuchen, inwieweit die festgestellte Unstabilität zum Ausdruck kommt in einer Reversion der betreffenden Varianten.

Im allgemeinen können wir sagen, dass tatsächlich in einigen Fällen eine völlige Reversibilität der eingetretenen Variationen beobachtet werden konnte. Dies hat sich herausgestellt bei den Variationen:  $O \rightleftharpoons S$  und  $O' \rightleftharpoons S'$  (§ 4 und § 5).

Es handelt sich hier um Varianten mit ausgesprochen verschiedenen Kolonietypen, welche dennoch in der Regel bei fortgesetzter Züchtung auf Platten auseinander entstehen.

Auch für die nicht extreme  $R_E$ -Variante konnte eine praktisch vollständige Reversion festgestellt werden. Durch wiederholte Überimpfung in flüssige Medien und altern lassen dieser Kulturen wurde die Ausgangsform S zurückerhalten (§ 6).

Gegenüber diesen unverkennbaren Fällen von Reversibilität eingetretener Variationen steht in erster Linie die extreme  $R_E$ -Form, bei der trotz vieler Versuche nur eine partielle Reversion erzielt werden konnte.

Es muss weiter betont werden, dass es in verschiedenen Fällen gar nicht gelungen ist eine Reversion zu bewerkstelligen. Dies gilt vor allem für die Variationen, welche durch das Verschwinden des Wandstoffbildungsvermögens gekennzeichnet sind, nämlich  $R \rightarrow O$  (S) (§ 2) und  $R' \rightarrow O'$  (S') (§ 4).

Ebenso wie bei der Stabilität der Varianten sehen wir, dass auch bei der Reversibilität der Variationen alle denkbaren Fälle realisiert sind.

c. *Ist eine gerichtete Aufeinanderfolge der Übergänge festzustellen?*

Für jene Fälle, wobei sich keine Reversibilität der Übergänge zeigt, erhebt sich die Frage, ob man von einer gerichteten Aufeinanderfolge der Übergänge sprechen kann.

Schon ein kurzer Blick auf das Schema überzeugt uns, dass davon sicherlich nicht die Rede sein kann. Dies folgt u.a. aus der Tatsache, dass bisweilen eine einzige Variante die Bildung zweier, voneinander sehr verschiedene Varianten veranlassen kann. So kann z.B. S sowohl die O- als auch die R<sub>E</sub>-Form, R sowohl S- (und O) als auch die R'-Form ergeben.

Aber auch der Umstand, dass es nie möglich war um aus S und O den R-Typus oder aus S' und O' den R'-Typus zu erhalten, spricht gegen die Auffassung, dass die beobachteten Übergänge Teilstrecken eines Zyklus bilden. Jedenfalls erscheint es uns ausgeschlossen alle beobachteten Formen, selbst wenn man sich nur auf untereinander zellmorphologisch verschiedene Typen beschränkt, in einen Zyklus zu vereinigen.

d. *Korrelierte und unabhängige Variation von Eigenschaften.*

Wenn wir uns von den verschiedenen Übergängen und den hiermit verbundenen Veränderungen in der Kolonieform, in zellmorphologischer und biochemischer Hinsicht Rechenschaft geben, dann sind die folgenden Punkte hervorzuheben.

Für fast alle Konstituenten des Dissoziationsmusters finden wir eine sehr deutliche Korrelation zwischen der Form und dem Aussehen der Kolonie einerseits und dem zellmorphologischen Charakteristikum (§ 7) andererseits. So ist z.B. „roughness“ verknüpft mit längeren Zellen; auch in der Literatur wird dieser Zusammenhang sehr oft erwähnt (HADLEY, 1937).

Auf die obengenannte Korrelation bilden die Varianten (S und O) und (S' und O') jedoch eine Ausnahme.

Für jede dieser Kombinationen gilt, dass der Unterschied im Kolonieaussehen recht deutlich ist, während das zellmorphologische Charakteristikum nicht oder nur sehr wenig differiert. Dasselbe gilt für die grossen, platten und nur in geringem Masse rauhen, fast glatten wand-



stoffbildenden Kolonien, welche bei der Züchtung des R-Typus entstehen können. Auch hier ist der zellmorphologische Unterschied mit R nur sehr gering (§ 2).

Fälle einer Korrelation zwischen morphologischer und physiologischer Variation treten ebenfalls auf und zwar bei der Dissoziation der instabilen Typen R und R' in die Varianten O und S und O' und S' (§ 2 und § 4). R mit seinen wandstoffbildenden Varianten einerseits und R' mit seinen wandstoffbildenden Varianten andererseits sind eigentlich als zwei gleichförmige Gruppen im Dissoziationsmuster zu betrachten, welche aber auf verschiedenem zellmorphologischem Niveau liegen.

Gegenüber diesen Fällen mit unverkennbarer Korrelation abweichender Eigenschaften, stehen aber auch andere Fälle, bei welchen wir zu einer unabhängigen Veränderung dieser Eigenschaften schliessen müssen. Sowohl der Übergang  $R \rightarrow R'$  als auch der Übergang  $S \xleftrightarrow{\leftarrow} R_E^o$ ,  $R_E \rightarrow A$ ,  $S' \rightarrow S$ ,  $S \rightarrow R_E$  und  $S \xleftrightarrow{\leftarrow} O$  bringen mehr oder weniger tiefgreifende Änderungen in Kolonie- und zellmorphologischer Hinsicht mit sich; es gibt jedoch keine Anweisungen, dass diese Veränderungen auch den Stoffwechsel beeinflussen.

e. *Der Einfluss äusserer Faktoren auf das Eintreten der Dissoziation.*

Wie schon früher bemerkt, schien es erwünscht ebenfalls dem Punkt Aufmerksamkeit zu schenken, in welchem Masse das Eintreten der beobachteten Dissoziationserscheinungen von äusseren Faktoren bestimmt wurde.

Wenn wir die betreffenden Daten aus diesem Gesichtspunkt betrachten, dann können wir die beobachteten Übergänge sogleich in zwei Gruppen verteilen. Einerseits haben wir in § 2 und in § 4 gesehen, dass der Übergang von  $R \rightarrow O$  (S) und von  $R' \rightarrow O'$  (S') unter normalen Kulturbedingungen „spontan“ stattfindet, andererseits gilt für fast alle andere Übergänge, dass sie nur erhalten werden nach Anwendung besonderer Massregeln, wie z.B. altern lassen von Flüssigkeitskulturen und dann noch in sehr geringer Frequenz.

Für diese zweite Kategorie würde man neigen zur Schlussfolgerung, dass die Dissoziation ein launisches Phänomen ist, bei welchem ein besonderer physiologischer Zustand der Zellen, oder eine Koinzidenz hiervon mit einem bestimmten Komplex äusserer Bedingungen, von durchschlagender Bedeutung wäre.

Die Dissoziationsfälle der ersten Gruppe boten uns mehr Aussicht den Einfluss äusserer Faktoren eingehender zu studieren.



Betrachten wir hierzu zunächst die in § 2 mitgeteilten Beobachtungen über den Übergang  $R \rightarrow O$  (S), wie dieser sich bei der fortgesetzten Kultur auf festen Nährböden manifestiert.

Wir sehen dann, dass beim Abstreichen einer Suspension eines sich aktiv vermehrenden Tibi-Klümpchens sowohl auf Hefewasser-Gelatine-Saccharoseplatten als auch auf Hefewasser-Glucoseagarplatten man nach Bebrütung fast immer Platten mit uniformen Kolonietypen erhält, welchen Typus wir als R bezeichnet haben. Stricht man jedoch eine Suspension einer derartigen Kolonie auf eine zweite Platte gleicher Zusammensetzung ab, dann findet man neben den für die erste Platte charakteristischen R-Kolonien immer auch andere Kolonien, welche wir als O und S bezeichneten und welche sich von der ursprünglichen Form durch den Verlust des Vermögens zur Wandstoffbildung aus Saccharose unterscheiden.

Diese Feststellungen besagen nun, dass in dem als Ausgangsmaterial benutzten Tibi-Klümpchen nur eine einzige Form von *Betabacterium vermiforme* vorkommt und dass die bloße Überbringung der Zellen dieser R-Form auf Platten keine Veränderungen darin auslöst, oder mit anderen Worten, dass derartige Platten einen zuverlässigen „Detektor“ für die primäre Anwesenheit von Variantenzellen bilden.

Wenn also auf der zweiten Kulturplatte abweichende Kolonietypen auftreten, dann müssen wir schliessen, dass während dem Auswachsen der Kolonien der ersten Platte ein Teil der Zellen eine Veränderung erlitten hat, welche sich nun auf der zweiten Platte als Dissoziation zeigt.

Es möge hinzugefügt werden, dass eine mikroskopische Untersuchung der gelatinösen Kolonien auf den Saccharosegelatineplatten diese Ansicht wesentlich stützt. Es zeigt sich nämlich, dass derartige Kolonien immer eine grössere oder kleinere Anzahl von Zellen enthält, welche das Vermögen zur Wandstoffbildung aus Saccharose offenbar eingebüsst haben: neben Gruppen von Stäbchen, welche in mehr oder weniger gut sichtbaren Kapseln liegen, kommen immer auch regellose Anhäufungen von augenscheinlich nicht-eingekapselten, kürzeren Individuen vor.

Was die primären Kolonien auf Glucoseagarplatten anbelangt, hier verrät die Heterogenität der Kolonien sich oft durch die Anwesenheit kleiner marginalen Auswüchse.

Nun muss man bedenken, dass dieselben Zellen, welche für die Entstehung der Variantenzellen auf der ersten Platte verantwortlich sind, nicht zur Entstehung von Nachkommen mit anderen Eigenschaften als jenen des R-Typus Veranlassung gegeben haben würden, falls sie sich in

dem Tibi-Klumpchen oder in der Flüssigkeitskultur vermehrt hätten. Wir dürfen daher schliessen, dass es sich bei den Kolonien handelt um eine Auslösung der Dissoziation durch äussere Faktoren, *in casu* durch diejenigen Bedingungen, welche in den auf Platten wachsenden Kolonien herrschen.

Die auffällige Tatsache, dass die eingetretenen Veränderungen nur auf einen Teil der Zellen beschränkt bleiben, findet eine Erklärung in der Überlegung, dass die Zellen einer Kolonie sehr voneinander abweichenden Bedingungen bezüglich der Konzentration der Nährstoffe, der Stoffwechselprodukte, usw. ausgesetzt sind.

Zieht man diesen Gesichtspunkt in Betracht, dann kann es nicht wundern, dass die Anzahl der Variantenkolonien bei der Aussaat verschiedener Kolonien des R-Typus oft beträchtlichen Schwankungen unterworfen ist. Man kann nicht erwarten, dass die für das Auftreten von Variantenzellen bestimmenden Bedingungen in jeder Kolonie im selben Augenblick realisiert sind. Und da die Variantenzellen nach ihrem Entstehen sich auch in der heranwachsenden Kolonie vermehren, werden sie in den verschiedenen Kolonien nach einem bestimmten Zeitverlauf in wechselnder Zahl vorhanden sein.

Das in § 2 Mitgeteilte lehrt, dass infolge der schwankenden Anzahl der Variantenzellen in Kolonien einer und derselben Platte es nicht möglich war einen deutlichen Einfluss von den Kulturbedingungen, worunter die Kolonien gewachsen waren, auf den Prozentsatz der Variantenzellen in diesen Kolonien festzustellen. Weder die Zusammensetzung des Nährmediums — Glucose oder Saccharose —, noch der Gelatinegehalt, noch die Änderung der Gasatmosphäre, in welcher kultiviert wurde, zeigten einen deutlichen Einfluss auf die Dissoziationsfrequenz.

Dass dennoch die äusseren Bedingungen von wesentlicher Bedeutung sind für das Auftreten von Variantenzellen wird nun wieder klar, wenn wir das unberechenbare Wachstum in Kolonien ausschalten und uns den in § 3 beschriebenen Beobachtungen bezüglich der fortgesetzter Kultur in flüssigen Medien zuwenden. Wir brauchen hier nur an die Tatsache zu erinnern, dass nach einer Anzahl von Überimpfungen, Kulturen erhalten wurden, aus welchen beim Abstreichen auf der als „Detektor“ benutzte Saccharosegelatineplatte keinerlei Variantenkolonien mehr zur Entwicklung kamen. Dieses Resultat lässt sich nur teilweise einem Überwachsen der O- bzw. S-Typen durch den R-Typus zuschreiben. Gesonderte Versuche lehrten, dass auch die beiden ersten Typen sich in dem Hefewasserglucosemedium vorzüglich entwickelten. Die Möglichkeit,



dass das genannte Medium eine Reversion von O und (oder) S zu R veranlasst, ist durch die negativen Resultate diesbezüglicher Versuche auszuschliessen. Andererseits unterliegt es kaum einem Zweifel, dass im Hefewasserglucosemedium eine Dissoziationsauslösung für den R-Typus fehlt.

Es muss aber betont werden, dass nichtdestoweniger die Dissoziationsfähigkeit bestehen bleibt, wie erhellt aus den Beobachtungen, dass die auf der „Detektor“-Platte gebildeten Kolonien nach Aussäung stets sogleich wieder O- und S-Typen zur Entwicklung bringen.

Doch wäre es verfehlt aus dem Hervorgehenden zu folgern, dass überhaupt für das Eintreten der Dissoziation und für die Erklärung der wechselnden Anzahl von in den ursprünglichen Kolonien vorhandenen Variantenzellen ausschliesslich die äusseren Bedingungen in Betracht gezogen werden müssen. Bei der Züchtung von R-Kolonien (von Glucoseagar) auf die Saccharosegelatine-„Detektor“-Platte können doch Variantenzellen zuweilen gänzlich fehlen, insbesondere trifft dies zu für diejenigen R-Kolonien, welche aus den „stabilisierten“ Flüssigkeitskulturen erhalten worden sind.

Diese Tatsache rechtfertigt auch der inneren Beschaffenheit der Zellen Bedeutung beizulegen. Gerade dieses gelegentliche Ausbleiben der Dissoziation spricht dafür, dass die Dissoziationsfrequenz, d.h. die Anzahl der bei der Kolonieentwicklung *abgespalteten* Zellen, auch Schwankungen, wobei innere Faktoren eine Rolle spielen, unterliegt. Diese Variation in der inneren Beschaffenheit — d.h. die untereinander verschiedene Widerstandsfähigkeit der Zellen hinsichtlich der Dissoziationsauslösung — muss zweifellos zum Teil der Kulturvorgeschichte der Zellen, d.h. den Unterschieden in äusseren Bedingungen während der Entwicklung in den vorhergehenden Kulturen, zugeschrieben werden.

Wir werden nun versuchen diese Resultate der eigenen Untersuchung in Beziehung zu bringen mit jenen Ansichten, die bisher über das Wesen der Dissoziationserscheinung geäussert wurden. In Kapitel X § 3 nannten wir als wichtigste Theorien: die zyklische Theorie, die Individualitätstheorie und die Mutationstheorie.

Von allen diesen Theorien kann man allerdings aussagen, dass sie nur Hypothesen sind, für welche keine direkten, überzeugenden Beweise anzuführen sind. Im Folgenden wollen wir uns abfragen, inwieweit die beobachteten Erscheinungen sich mit diesen Theorien vereinigen lassen.

In erster Linie werden wir die von HADLEY propagierte zyklische



Theorie betrachten, welche in ihrer letzten Formulierung besagt, dass die in morphologischer Hinsicht verschiedenen Varianten als zeitlich fixierte Stadien eines ontogenetischen Entwicklungszyklus aufzufassen sind. Wie schon in Kapitel X betont, steht und fällt eine solche Auffassung mit dem Vorhandensein bzw. Fehlen einer gerichteten Aufeinanderfolge der morphologisch verschiedenen Varianten.

Das unter c Erwähnte lehrt nun, dass es auch für *Betabacterium vermiforme* unmöglich ist die Übergänge aller morphologisch verschiedenen Varianten so zu ordnen, dass sie in einem Zyklus aufgenommen werden.

Selbst wenn man annimmt, dass das Bestehen der fehlenden Übergänge später noch festgestellt werden könnte, bleibt es unmöglich diesen Zyklus als einen ontogenetischen Entwicklungsgang zu betrachten, da die unter b gegebenen Ausführungen keinen Zweifel lassen, dass in einem solchen morphologisch konstruierten Zyklus mit Sicherheit „Kurzschlüsse“, d.h. Reversionen von Teilen des Entwicklungszyklus, vorhanden sind.

Aus diesen Gründen muss geschlossen werden, dass die zyklische Theorie für die Dissoziationerscheinung bei *Betabacterium vermiforme* keine befriedigende Erklärung geben kann.

Betrachten wir nun die Anwendbarkeit der von VAN LOGHEM befürworteten „Individualitätstheorie der bakteriellen Veränderlichkeit“.

Wenn wir in dieser Hinsicht den unter den gebräuchlichen Kulturbedingungen so regelmässig eintretenden, in § 2 beschriebenen, Übergang  $R \rightarrow O(S)$  ins Auge fassen, ergeben sich, da dieser Übergang irreversibel erscheint, im Gedankengang VAN LOGHEM's zwei Möglichkeiten. In erster Linie könnten wir es hier — und die bisher erzielten Erfahrungen sprechen stark dafür — mit einem wirklich bleibenden Verlust einer Eigenschaft, in diesem Falle der Wandstoffbildung, zu tun haben. Die S- und O-Typen sind dann als Atropheonten zu charakterisieren. Diese Auffassung wurde dann aber besagen, dass es sich hier um eine pathologische Reaktion auf einen schädlichen Reiz der Aussenwelt handle. Jedoch ist eine solche Interpretation bei einer Züchtung von kurzer Dauer auf einem, dem Stoffwechsel des betreffenden Bakteriums rationell angepassten Nährboden nicht so leicht anzunehmen. Um so mehr nicht, als sich die Ausgangsform neben den Varianten vorzüglich zu entwickeln pflegt.

Diese Überlegung bildet nun zugleich auch ein Bedenken gegen der zweiten möglichen Auffassung über die Art der beobachteten Variation,

nämlich, dass man hier mit einer adaptativen Variation zu tun hat, welche, obwohl im Wesen reversibel, doch lange Zeit beständig bleibt. Schwierig zu vertreten scheint mir die Ansicht bei einem solchen Fixat von einer Adaptation zu sprechen, weil wir doch sehen, dass sich die Ausgangsform, auch beim fortgesetzten Kultivieren auf demselben Medium vorzüglich entwickelt.

Noch schwieriger wird es den Begriff Adaptation mit den bleibend reversiblen Veränderungen in Beziehung zu bringen, nämlich mit den in §. 5 beschriebenen Übergängen  $O \rightleftharpoons S$  und  $O' \rightleftharpoons S'$ . Man sieht diese Übergänge in beiden Richtungen und unter genau denselben Bedingungen auftreten; dadurch stossen wir hier auf die Schwierigkeit, dass eine einmal angepasste Form durch „Anpassung“ an dasselbe Medium wieder zur Ausgangsform zurückkehrt.

Wir haben in Kapitel X § 3 darauf hingewiesen, dass es wohl noch denkbar ist diese Beobachtungen mit der Adaptationstheorie in Einklang zu bringen, jedoch ist eine derartige Erklärung sicherlich sehr gekünstelt.

Noch schwieriger ist es diese Theorie auch zur Interpretation jener Formen anzuwenden, welche, wie  $R_E$ ,  $R_E^\circ$  und A, nur mehr oder weniger inzidentell in alten Flüssigkeitskulturen auftraten. Diese Formen zeigten sich als relativ stabil, also nicht bleibend verändert; teilweise kehrten sie selbst zur Ausgangsform (S) wieder zurück. Im Schema von VAN LOGHEM müssen sie aber als Adaptate betrachtet werden. Wenn man sich aber realisiert, dass diese Formen in den Kulturen, aus welchen sie isoliert wurden, im Verhältnis zur unveränderten Ausgangsform nur in geringer Anzahl vorhanden waren, ist ihr Auftreten schwerlich mit dem Begriff der Adaptation in Beziehung zu bringen. Will dieser Begriff einen Sinn haben, dann muss er besagen, dass die neue Form besser an die betreffenden Kulturbedingungen angepasst ist als die Ausgangsform und also in solchen Kulturen vorherrschend erscheinen muss. Dies hat sich nie gezeigt; der Gegenteil ist der Fall.

Zusammenfassend können wir also schliessen, dass der Gedankengang VAN LOGHEM's ebensowenig wie die zyklische Theorie imstande ist die beobachteten Erscheinungen auf befriedigende Weise zu interpretieren.

Schliesslich haben wir uns dann die Frage vorzulegen, ob die beobachteten Veränderungen mit der Mutationslehre, so wie sich diese im Laufe der Zeit entwickelt hat, in Einklang zu bringen sind. Weil aber auch hierbei von einer direkten Beweisführung nicht die Rede sein kann, empfiehlt es sich diese Frage ganz allgemein, für sämtliche bezüglich

der Bakterien bekannt gewordenen Dissoziationserscheinungen, zu diskutieren.

Wie schon in Kapitel X bemerkt worden ist, ist hierfür u.a. eine mehr eingehende Betrachtung der rezenteren Untersuchungen über Genmutationen bei höheren Organismen unentbehrlich.

Das nächstfolgende Schlusskapitel wird also einer allgemeinen Diskussion der Anwendbarkeit der Mutationstheorie zur Erklärung der Dissoziationserscheinungen gewidmet sein.



## KAPITEL XII.

### BETRACHTUNGEN ÜBER DAS WESEN DER DISSOZIATION IM LICHT DER NEUEREN UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE GENMUTATION BEI HÖHEREN LEBENSFORMEN.

§ 1. BEMERKUNGEN ZUR FRAGE OB DER BEGRIFF GENMUTATION SICH AUF BAKTERIEN ANWENDEN LÄSST.

Bevor wir einen Vergleich zwischen den Dissoziationserscheinungen und jenen bei der Genmutation der höheren Lebensformen auftretenden Erscheinungen durchführen, müssen wir uns die Frage vorlegen, ob ein solcher Vergleich überhaupt zulässig ist, m.a.W. ob es im Prinzip möglich ist anzunehmen, dass Genmutation bei Bakterien vorkommt.

Wir haben schon in Kapitel X bemerkt, dass die von früheren Autoren ausgesprochene Meinung, dass der Begriff „Mutation“ nicht mit der Inkonstanz und Reversibilität der bakteriellen Abänderungen zu vereinigen wäre, heutzutage ihre zwingende Kraft grösstenteils eingebüsst hat. Es wäre aber möglich, dass andere Gründe gegen eine Anwendung des Genmutationsbegriffes auf Bakterien sprechen würden. Wollen wir dieser Frage näher treten, dann müssen wir uns über die bestehenden Auffassungen hinsichtlich des Vorkommens sexueller Prozesse, von Kernen, Chromosomen und Genen bei Bakterien Rechenschaft ablegen.

Betrachten wir in erster Linie die Frage, ob bei Bakterien, wie bei den anderen Organismen, das Vorhandensein von Genen anzunehmen ist, dann kommt es mir vor, dass diese Frage gewiss bejahend zu beantworten ist. In der Regel finden wir doch, dass die Nachkommen einer einzigen Bakterienzelle untereinander in allen markanten Eigenschaften übereinstimmen, m.a.W. auch bei den Bakterien stellt sich der Begriff Erblichkeit ein.

Es ist nun nicht einzusehen, wie die prinzipielle Gleichheit der Eigenschaften von den beiden Tochterzellen gesichert sein würde, wenn die Erblichkeit nicht an materielle Träger — Gene — gebunden wäre.

Einerseits scheint das Vorkommen von Erbeinheiten also auch bei den Bakterien unabweisbar zu sein, andererseits erhebt sich jedoch die Frage, wie eine gleichmässige Verteilung des Erbmaterials bei der Zellteilung

anders gewährleistet sein könnte, als auf die Weise wie diese bei der Zellteilung höherer Organismen realisiert ist.

Ohne jedoch im Vorhinein die Möglichkeit einer prinzipiell anderen Lösung dieser Frage verwerfen zu wollen, müssen wir erst untersuchen, inwieweit in der Tat Gründe vorhanden sind um den Bakterien einen Zellkern, mit den darin untergebrachten Genen, abzusprechen.

Bezüglich der Frage ob wir bei Bakterien einen morphologisch differenzierten Kern annehmen dürfen, sind die Meinungen sehr verteilt.

Die im Laufe der Zeit geäußerten Ansichten lassen sich in vier Gruppen verteilen (HENRICI, 1934).

1. Die Bakterien besitzen keinen Nukleus oder ein dementsprechendes Äquivalent.

2. Die gesammte Bakterienzelle besteht aus einem Nukleus mit stark reduziertem oder gänzlich fehlenden Zytoplasma.

3. Das Äquivalent eines Nukleus ist in der Form einer durch das ganze Zytoplasma feinverteilten Kernsubstanz vorhanden (diffuser Nukleus).

4. Es besteht ein normaler, morphologisch differenzierter Nukleus.

Während die erste und die zweite Ansicht sicherlich nicht befriedigen, scheint die dritte von ZETNOW (siehe HENRICI) stammende Theorie durch die Tatsache unterstützt zu werden, dass die FEULGEN-Reaktion (eine spez. Reaktion auf Nukleinsäuren) in den Bakterienzellen eine diffuse, rötliche an das gesammte Bakterienprotoplasma gebundene Färbung hervorruft.

Es sei hier verwiesen auf die Arbeiten von PIETSCHMANN (1931) und PIETSCHMANN und RIPPPEL (1932), in welchen man zugleich eine Übersicht über die Befunde anderer Forscher antrifft.

PIETSCHMANN und RIPPPEL schliessen aus einer bei verschiedenen Bakterienarten erzielten positiven, diffusen FEULGENschen Nuklealfärbung auf die Abwesenheit eines Kerns. Sie schliessen u.a.: „Die diffuse Verteilung der nach FEULGEN nachgewiesenen nuklealpositiven Substanz ist für *Bac. mycoides* und die anderen untersuchten Bakterien der *Normalzustand*“<sup>1)</sup>).

Will man vorläufig an diese Ergebnisse die Annahme knüpfen, dass die Bakteriennukleinsäure verwandt ist mit der Kernnukleinsäure anderer Zellen, so liegt der Gedanke nahe der feinverteilten nuklealpositiven

<sup>1)</sup> PIETSCHMANN und RIPPPEL betonen jedoch, dass es keineswegs ausgeschlossen ist, dass auch andere, noch unbekannte Stoffe diese Reaktion geben.



Substanz die Rolle der sonst in den Zellen differenzierten Kernbestandteile zuzuschreiben.

Man stösst dann aber auf die Schwierigkeit, wie man sich während der Zellteilung eine gleiche Verteilung des Erbmaterials vorzustellen hat.

Es fragt sich nun aber, ob die oben angeführten Resultate tatsächlich als unvereinbar mit der Ansicht des Vorhandenseins eines morphologisch differenzierten Kerns in den Bakterien zu betrachten sind.

Jenen Resultaten stehen nämlich die Angaben zahlreicher anderer Forscher gegenüber, nach welchen mit Hilfe bestimmter Färbmethoden, insbesondere der GIEMSA-Färbung, in sehr verschiedenen Bakterienzellen Strukturen nachgewiesen worden sind, welche einer Deutung als Kern, „Kernäquivalent“ oder Chromosom durchaus zugänglich sind. Die Unmöglichkeit die Nuklealnatur dieser Strukturen mit Hilfe der FEULGEN'schen Reaktion zu bestätigen, könnte nun sehr wohl ihren Grund darin finden, dass die Bindung der Nukleinsäuren an die Proteine des Kerngerüstes bei den Bakterien lockerer ist wie dies bei den Zellen anderer Organismen der Fall ist. Die bei der FEULGEN'schen Reaktion angewandte Säure-Hydrolyse könnte sehr wohl eine Abspaltung der Nukleinsäuren und damit eine diffuse Verteilung der reagierenden Substanz in die Zelle bewirken<sup>1)</sup>.

Es scheint mir also nicht zwingend um nur auf Grund des negativen Ausfalles der Versuche um bei Bakterien mit Hilfe der FEULGEN'schen Reaktion morphologisch differenzierte Kernstrukturen nachzuweisen, den nach anderen Methoden aufgefundenen Strukturen alle Bedeutung für das Kernproblem abzusprechen.

Bezüglich dieser letztgenannten Ergebnisse werde ich mich auf eine kurze Besprechung der rezenten, sorgfältigen Arbeiten BADIAN's beschränken (1933, 1935).

Dieser Forscher meint sowohl bei *Bac. subtilis*, wie bei *Bac. mycoides* und *Bac. megatherium* einen einfachen Kern in der Form eines frei im Plasma gelegenen Chromosoms gefunden zu haben.

Dies würde bedeuten, dass in Übereinstimmung mit jenen Organismen, die einen echten Kern besitzen, auch bei den Bakterien linear geordnete Gene vorkommen; durch eine Längsspaltung des Chromosoms würde dann bei der Zellteilung der Übergang des gesamten Genkomplexes garantiert sein. Der Spaltungsprozess kann sich vor der Zellteilung

<sup>1)</sup> Nachdem dieser Passus geschrieben war, nahm ich Kenntnis von der Arbeit STILLE's (1937), worin diese Ansicht eine experimentelle Bestätigung findet.



wiederholen, sodass eine Zelle zuweilen vier und noch mehr Chromosomen enthält.

BADIAN gibt an, dass im Entwicklungszyklus Zelle  $\rightarrow$  Spore  $\rightarrow$  Zelle auf die Haplophase mit dem univalenten Chromosom als Resultat einer azytogenen Autogamie eine Diplophase folgt. Bei diesem Prozess von Autogamie verschmelzen zwei Tochterchromosomen zu einem bivalenten Chromosom; das Stadium mit dem bivalenten Chromosom ist nur von kurzer Dauer. Durch zwei aufeinanderfolgende Teilungen entstehen vier univalente Chromosomen, wobei eines bei der Endosporenbildung in die Spore gelangt, während die drei übrigbleibenden zugrunde gehen; mit der Endospore beginnt die Haplophase.

Es fragt sich, ob wir die Resultate BADIAN's annehmen können. Mit Hinsicht auf seine Beschreibung und auf die schematisierten Wiedergaben der in der Zelle stattfindenden Prozesse, scheint das Vorhandensein eines Chromosoms und der oben beschriebenen Autogamie durchaus annehmlich; besieht man jedoch nur seine Mikrophotographien, dann ist es nicht möglich diese als eine ausreichende Dokumentierung der von ihm gegebenen Ausführungen zu betrachten.

Wir müssen denn auch bekennen, dass direkte Beweise für das Bestehen eines morphologisch differenzierten Trägers erblicher Eigenschaften, der auf den Kern Anspruch machen kann, bisher nur noch schwach fundiert sind. Andererseits machen doch indirekte Überlegungen dies wohl sehr wahrscheinlich. In einer Abhandlung LINDEGREN's (1935) findet man diesen Gesichtspunkt näher dokumentiert; er kommt nach einer ausführlichen Diskussion zum Schluss, dass eine gleichmässige Verteilung des Erbmaterials auf die Tochterzellen unumgänglich mit der Lage der Erbinheiten in einem Kern verknüpft sein muss.

Bezüglich des Vorhandenseins geschlechtlicher Prozesse bei Bakterien scheint mir die Annahme einer allgemeinen Gültigkeit der durch BADIAN bei *Bac. megatherium* und *Bac. subtilis* gefunden azytogenen Autogamie noch sehr voreilig.

Falls jedoch bei mehreren Bakterienarten, unter welchen auch nicht-Sporenbildner, die Sexualität tatsächlich ein normal vorkommender Prozess sein würde, dann scheint mir die Möglichkeit, dass in allen diesen Fällen ausschliesslich die Autogamie mit seinem einfachen Mechanismus eine Rolle spielt, sehr gross.

Überlegen wir uns hinsichtlich der Dissoziation die Möglichkeit einer Genmutation bei Bakterien, dann müssen wir uns daher abfragen, inwieweit Variationen die Folge von Veränderungen in den Genen sein können,

unabhängig davon ob und in welcher Weise sich Sexualität bei den Bakterien äussert.

Viele Forscher werden durch das Fehlen einer Bakteriensexualität dazu gebracht schon im voraus abzusehen von einer ernsthaften Erwägung der Frage, ob die bakterielle Veränderlichkeit genotypischen Abänderungen zugeschrieben werden könnte; so bemerkt z.B. SIRKS (1933), dass man aus diesem Grund bei Bakterien nicht von Mutation sprechen darf.

Soweit diese Forscher zum Ausdruck bringen wollen, dass demzufolge *Beweise* für genotypische Veränderungen und darum also auch für eine Mutation nicht erbracht werden können, kann man ihnen selbstverständlich nur beipflichten. Andererseits darf man nicht aus den Augen verlieren, dass auch das Gegenteil, nl. die Ansicht, dass genotypische Veränderungen bei Bakterien nicht vorkommen, ebenfalls nicht zu beweisen ist.

BEIJERINCK schrieb im Jahre 1912 bezüglich dieser Frage folgendes: „Das Fehlen der Amphimixis bei vielen Mikroorganismen bedingt natürlich eine Verschiedenheit mit den sexuell differenzierten, von grosser Bedeutung in experimenteller Beziehung, weil demzufolge das für die Untersuchung der letzteren so wichtig geworden Hilfsmittel der Bastardanalyse für die asexuellen Mikroben fehlt.

Prinzipiell ist das aber gleichgültig, weil der Mutationsvorgang an sich unabhängig von der Sexualität ist; es liegt deshalb keine genügende Ursache vor um anzunehmen, dass die Mutanten von Organismen mit Amphimixis in irgend einer prinzipiellen Beziehung verschieden sein sollten von den Mutanten der Asexuellen.“

Es ist nun einleuchtend, dass die aus den Untersuchungen BADIAN's hervorgehende Möglichkeit des Vorhandenseins einer azytogamen Autogamie bei bestimmten Bakterienarten nichts an der von BEIJERINCK hervorgehobenen Unmöglichkeit, um durch die Bastardanalyse einen experimentellen Beweis einer eventuell eingetretenen Genmutation zu liefern, verändert.

Ich möchte mich hier der Meinung BEIJERINCK's anschliessen, dass der Umstand, dass man vorläufig dem Genotypus der Bakterien nicht annähern kann, im Prinzip völlig los steht von der Möglichkeit des Auftretens genotypischer Veränderungen bei diesen Organismen.

Meines Erachtens besteht dann auch keinerlei Grund, um das Vorkommen einer Genmutation, derjenigen bei höheren Organismen experimentell bewiesenen analog, a priori bei den Bakterien zu verwerfen.

Wenn wir uns die Frage vorlegen, ob ausser Genmutation der Dissozia-



tion theoretisch noch andere genotypische Veränderungen zugrunde liegen könnten, dann liesse sich an Kombination, Bastardspaltung und jene Mutationen denken, welche auf Unregelmässigkeiten oder Abnormalitäten des Chromosomenmechanismus während der Teilung zurückzuführen sind, wie z.B.: *Non-Disjunction*, *Translocation*, *Fragmentation*, *Elimination* usw.

Mit Rücksicht auf das bereits Gesagte, können wir *Kombination* und *Bastardspaltung* von vornherein ausschalten. Halten wir vorläufig an dem Vorhandensein eines einzigen Chromosoms pro Zelle fest, dann fallen, wie LINDEGREN (1936) bemerkt hat, die meisten aufgezählten Mutationsmöglichkeiten weg und kommt wahrscheinlich nur die Genmutation in Betracht (Seite 123).

Bevor nun dazu überzugehen die Frage zu prüfen, ob und inwieweit die Erscheinungen der Bakteriendissoziation mit den rezenten Ergebnissen der Genmutationsforschung in Übereinstimmung sind, scheint es angebracht hier eine gedrängte Übersicht dieser Ergebnisse zu geben. Diese Übersicht soll namentlich zwei Zwecke dienen. Erstens habe ich eine Anzahl Beispiele gesammelt, welche zeigen mögen, dass auch bei höheren Organismen spontane labile Veränderungen bekannt geworden sind, welche dennoch von den betreffenden Forschern auf triftige Gründe als Genmutation gedeutet worden sind. Zweitens schien es mit Hinsicht auf die betreffenden bei den Bakterien gesammelten Erfahrungen von Bedeutung mit Beispielen zu belegen, dass auch bei höheren Organismen experimentell ausgelöste Genmutationen heutzutage vielfach nachgewiesen worden sind und dass derartige Mutationen in bestimmten Fällen ebenfalls auf experimentelle Weise rückgängig gemacht worden sind.

## § 2. EINIGE REZENTE BEOBACHTUNGEN ÜBER SPONTANE LABILE GENMUTATION BEI HÖHEREN LEBENSFORMEN.

Bei den höheren Lebensformen hat man im Laufe der Zeit eine Reihe von Veränderungen kennen gelernt, welche nach gründlicher Analyse auf Gen- oder Faktormutation, d.h. auf Veränderungen, welche sich in den Chromosomen lokalisierten Genen vollzogen haben, zurückgeführt werden müssen. Die typische Genmutation ist ein entweder spontan oder durch Induktion eintretendes Phänomen, welches sich meist als eine auffällige, sprunghafte, gut konstante Abänderung des Phänotypus erweist.

Zeigte sich im Anfangsperiode der Mutationsforschung, dass die



Genmutationen durch ihren stabilen Charakter gekennzeichnet zu sein pflügten, so haben weitere Forschungen auf dem Mutationsgebiet ans Licht gebracht, dass verschiedene inkonstante Variationen ebenfalls auf Genmutation, nämlich auf Mutation von mehr oder weniger labilen Genen zurückzuführen sind.

Ich will in diesem Paragraph einige Beispiele geben von in der letzten Zeit bekannt gewordenen Fällen spontaner, labiler Genmutation bei höheren Lebewesen, und über die damit zusammengehenden Erscheinungen berichten. Im folgenden Paragraph folgt dann eine Besprechung jener Fälle, bei welchen eine reversibele Genmutation experimentell ausgelöst worden ist.

Es ist zu bemerken, dass solche unstabile genotypische Variationen unter den von DE VRIES als „Zwischenrassen“ oder „eversporting varieties“ bezeichneten Variationen gefunden werden (ROELOFS, 1937).

Ein Beispiel einer genotypisch „eversporting variety“ ist die von DE VRIES und später von BAUR näher studierte Sippe *Anthirrhinum majus rubro-striatum*. Bei dieser Sippe zeigt die Blütenhülle schmalere und breitere rote Streifen auf gelbem Untergrund; gelegentlich treten an den sonst gestreift blühenden Pflanzen auch ganz rote Seitenäste und Sektoren auf. Nach Selbstung erhält man fortwährend in geringem Prozentsatz ganz rote Pflanzen.

BAUR (1922) hat dargetan, dass das eversporting striata-Merkmal dem Labilität eines Blütenfarbgens ( $pal^{rec}$ ) entspricht, wobei dann von somatischer Rückmutation aus dem rezessiven in den dominanten Status die Rede ist (STUBBE, 1933).

Ein ähnlicher Fall von labiler Genmutation ist die somatische Rückmutation des Blattfarbgens (*albostriata*). Es handelt sich hier um das Vorhandensein mosaikartig grün gefleckter Blätter, während auch grüne Sprosssektoren und ganz grüne Sprosse zum Vorschein kommen können (BAUR, 1922).

Ich möchte nun hervorheben, dass man bei der Genmutation zwischen dem Ausgangstypus und dem Mutantentypus event. eine Reihe phänotypischer Abstufungen, die man als das Resultat einer Reihe quantitativ genotypischer Differenzen betrachtet, antreffen kann.

Im Anschluss an die von ihm begründete Theorie über die Quantität der Gene hat GOLDSCHMIDT (1927) in diesem Zusammenhang den Begriff „multipler Allelomorphismus“ eingeführt.

Nach der Definition ist multipler Allelomorphismus Ausdruck quantitativer Mutabilität der Gene; multiple Allele sind Serien von Erbfaktoren,

deren zugehöriger Phänotypus als eine quantitativ abgestufte Reihe erscheint. Sie beeinflussen den gleichen Aussencharakter und liegen am gleichen Locus des Chromosoms.

Es sind z.B. bei *Anthirrhinum majus* verschiedene multiple Allelserien nachgewiesen, u.a. die Rad-Serie; nach KUCKUCK (1936) sollte es handeln um eine Serie mit 7 Allelen, welche Serie sich auf den allmählichen Übergang von zygomorphen zu radiären Blüten (Umbildung und Verkürzung der Blütenblätter der Ober- und Unterlippe) bezieht.

Es sei an dieser Stelle bemerkt, dass OEHLKERS (1930) in seinen Untersuchungen hinsichtlich cruciater *Oenotheren* multiplen Allelomorphismus, wobei zugleich die betreffenden Allele labil sind, als Erklärung hervorgehoben hat. Dies bezieht sich auf das „eversporting“ und relativ konstante „cruciata“-Merkmal, eine Blütenmissbildung, die man als „Sepalodie“ bezeichnet (Umwandlung eines Phyllomes in ein kelchblattähnliches Organ).

Bei *Oenothera biennis cruciata* (A2a) ist das *cruciata*-Merkmal „eversporting“. Diese Varietät ist gekennzeichnet durch Übergänge von fast reiner Sepalodie bis zu fast normalen Petalen, mit abwechselnd sepaloiden und petaloiden Zonen und Streifen. Nach OEHLKERS handelt es sich hier um: „kleine, massenhafte Mutationen, deren Inkonstanz sich nicht nur in verhältnismässig grossen Unterschieden unter den einzelnen Individuen einer Nachkommenschaft, sondern auch in Unterschieden innerhalb eines Individuums ausdrückt.“

Bei der inkonstanten *Oenothera biennis cruciata* konnte OEHLKERS, wenn er von Teilen eines einzigen Individuums ausging, einen ziemlich stark cruciaten Hauptzweig und einen relativ schwach cruciaten Rosettenseitenzweig, durch Selektion der am stärksten und am schwächsten cruciaten Individuen innerhalb weniger Generationen fast rein cruciate und fast normale Rassen erhalten.

Durch diese Selektionsversuche werden erblich verschiedene Linien erhalten, die durch aufeinanderfolgende quantitative Mutationsschritte entstanden sind.

Ausser der genannten inkonstanten, cruciaten Varietät hat OEHLKERS (1930, 1935) auch die konstante *Oenothera Lamarckiana cruciata*, in seine Untersuchung bezogen, welche Varietät beinahe rein sepaloid ist und relativ selten, dann aber in starken Sprüngen, zurückmutiert. OEHLKERS stellte bei einem Exemplar der genannten Varietät das Auftreten von einer Rosettenseitenzweig mit völlig normalen Blüten fest; er betrachtet dies als einen Fall ausgesprochener Knospen-Rückmutation.



### § 3. EXPERIMENTELLE AUSLÖSUNG VON MUTATION UND RÜCKMUTATION.

Die wichtige Rolle, welche die äusseren Bedingungen bei dem Eintreten der Bakterien-Dissoziation spielt, macht es nun wichtig auch den Einfluss der äusseren Bedingungen auf das Zustandekommen von Genmutationen bei höheren Organismen mit einigen Beispielen zu belegen.

So berichtet STUBBE (1930), dass bei *Anthirrhinum majus* die Mutationsrate, welche bei der nicht behandelten Sippe nur 1,15% betrug, nach einer Röntgenbestrahlung sowohl somatischer als auch generativer Zellen beträchtlich gestiegen war. Unter den induzierten Mutanten findet man auch Typen, welche spontan auftreten können.

BAUR (1932) hat Versuche unternommen, bei welchen er u.a. junge Keimlinge der genannten Pflanze verschieden starken chemischen oder physikalischen Reizen ausgesetzt hat. Nach solchen Behandlungen scheint ebenfalls die Zahl der echten Genmutationen zuzunehmen.

Bezüglich der Steigerung der Genmutabilität sind ebenfalls die Versuche STUBBE's (1935) über den Einfluss, welche das Altern der Samen von *Anthirrhinum* auf die Anzahl auftretender Mutationen hat, mitzuteilen. Zehn Jahre alte, noch keimfähige Samen von *Anthirrhinum majus* zeigten in der Aussaat eine Zunahme der Mutationsrate bis zu 14%, während der normale Prozentsatz bei einjährigen Samen ungefähr 1% war. *Diese Faktormutanten sind qualitativ dieselben, wie die spontanen und Bestrahlungsmutanten.*

STUBBE fragt sich ab, welche inneren Faktoren hierfür verantwortlich sind: „Schaffen vielleicht physiologische Vorgänge in dem Samen Strukturabänderung des Gen-Moleküls?“ Wenn dies der Fall wäre, bemerkt STUBBE, könnten diese innerlichen mutationsauslösenden Agentien gedeutet werden als äussere Beeinflussung des in Rede stehenden Kernes.

Die vielen und schönen Untersuchungen über Mutation bei *Drosophila* beziehen sich hauptsächlich auf die Mutationen verschiedener Gene, deren Auftreten durch Röntgenbestrahlung oder durch hohe Temperatur induziert worden ist. Diese experimentell ausgelösten Mutationen entsprechen den „spontanen“, natürlichen Mutationen und zwar nicht allein im Phänotypus, sondern auch hinsichtlich des Locus, an welchem sie auftreten. Auch bei *Drosophila* ist die Erscheinung der Rückgenmutation und des multiplen Allelomorphismus bekannt und gründlich untersucht.

Ich werde mich auf eine kurze Besprechung der Mutationen bloss



zweier „sex-linked“ Gene beschränken und zwar derjenigen, die nach ihrem phänotypischen Effekt als *forked* und *white* bezeichnet werden. Die Mutation am *forked*-Locus bezieht sich auf die Veränderung von normalen Borsten in *forked* Borsten, die Mutation am *white*-Locus bezieht sich auf die Farbenänderung der Augen von normal (rot) zu weiss. Bei den beiden genannten Genen, die im X-Chromosom von *Drosophila melanogaster* liegen, trifft man multiplen Allelomorphismus an. Unter dem Einfluss der Bestrahlung können sowohl somatische als auch gametische Hin- und Rück-Mutationen entstehen. Bei der Bestrahlung befruchteter Eier oder jungen Larven treten somatische Mutationen auf. Allerdings sind diese für eine genetische Prüfung unzugänglich, im Gegensatz zu den gametischen Mutationen, welche man durch Bestrahlung der Gameten erwachsener Tiere erhält. (TIMOFÉEFF-RESSOVSKY).

*forked*-Locus.

PATTERSON und MULLER (1930) und TIMOFÉEFF-RESSOVSKY (1933) u.a. haben ausführlich die durch Röntgenbestrahlung induzierten Mutationen am *forked*-Locus studiert.

Hierbei stellten PATTERSON und MULLER im Ganzen vier Allelomorphe fest: das Allel (F) *Normal*, mit normalen Borsten und drei Mutant-Allelomorphe, n.l. *very weakly forked*, mit einem Phänotypus, welcher *Normal* sehr nahe steht, *weakly forked* ( $f^w$ ) und *forked* (f). Beim vorletzten Fall ist das Merkmal der „forked“ Borsten weniger ausgesprochen als bei (f).

Die genannten Forscher beobachteten bei ihren Bestrahlungsversuchen des normalen F-Allels ausser der typischen *forked*-Mutante (mit einer guten Fertilität und Vitalität) auch einmal das Auftreten einer weniger typischen, *weakly forked*-Mutante, also eine Mutation von  $F \rightarrow f^w$ .

Sowohl TIMOFÉEFF-RESSOVSKY, als auch PATTERSON und MULLER gelang es, um durch Röntgenbestrahlung Rückmutation am *forked*-Locus zu induzieren. Nach einer vollständigen Reversion des *forked*-Allels zum *Normal*-Allel ( $f \rightarrow F$ ) zeigte sich, dass der induzierte non *forked* Typus bei einer weiteren Bestrahlung wieder zu *forked* mutieren könnte.

Es ist also mit einem und demselben Agens möglich Genmutation in beiden entgegengesetzten Richtungen zu induzieren ( $F \xrightarrow{\gamma} f$ ) und ( $f \xrightarrow{\gamma} F$ ). Die Frequenz der Mutation  $F \rightarrow f$  und  $f \rightarrow F$  erwies sich ungefähr gleich.

PATTERSON und MULLER beobachteten auch einen Fall „partieller Reversion“, eine Rückmutation von *forked*, wobei nicht das *Normal*-Allel, sondern nach ihrer Meinung wahrscheinlich ein *very weakly forked*-Allel — sehr nahe bei *Normal* stehend — auftrat. Der entstandene Typus war non-*forked* mit Ausnahme der linken hinteren scutellar Borsten.

Die statistische Untersuchung von TIMOFÉEFF-RESSOVSKY hat gezeigt, dass unter den 19000 bestrahlten *non-forked* Gameten 5 *forked*-Mutationen, unter den 29000 bestrahlten *forked*-Gameten 7 Rückmutationen zu *Normal* vorkamen.

*white-Locus.*

Die Mehrzahl der bei *Drosophila melanogaster* auftretenden „spontanen“ Mutationen beziehen sich auf den *white-Locus*. Ausserdem können spontan mehrere Allelomorphen auftreten. Auch am *white-Locus* mit einer Serie von mehreren geschlechtsgebundenen Augenfarbenallelen haben PATTERSON und MULLER (1930) und TIMOFÉEFF-RESSOVSKY (1935) durch Röntgenbestrahlung das Auftreten von Mutationen induziert. Letzterer berichtet in seiner Veröffentlichung, dass er von der *white*-Serie das normale Allel und acht Mutant-Allele bestrahlt hat; nach der Augenfarbe angeordnet ergibt sich die Reihe:

W (normal-rotäugig) —  $w^{co}$  (coral) —  $w^b$  (blood) —  $w^c$  (cherry) —  $w^a$  (apricot) —  $w^e$  (eosin) —  $w^{bf}$  (buff) —  $w^t$  (tinged) — *w* (*white*).

Durch Bestrahlung wurden sowohl somatische als auch gametische Mutationen erzielt. Die von TIMOFÉEFF-RESSOVSKY erreichten Resultate sind als folgt:

1. Direkte Mutationen von *Normal* zu *white* ( $W \rightarrow w$ ).

Eine Rückmutation von *white* direkt zu *Normal* wurde gametisch nie erzeugt; die Rückmutation vollzieht sich in zwei Schritten, via das *eosin*-Allel ( $w \rightarrow w^e \rightarrow W$ ).

2. Erzeugung der gleichen Allele aus beiden extremen Gliedern:  $W \rightarrow w^b \leftarrow w$ ;  $W \rightarrow w^e \leftarrow w$ .

3. Ein durch Bestrahlung aus *Normal* erzeugtes *eosin*-Allel kann unter weiterer Bestrahlung wieder zurückmutieren zu *Normal* ( $W \xrightarrow{\leftarrow} w^e$ ).

Auch wurde festgestellt, dass bei Erzeugung einer Rückmutation aus spontanem *eosin* zu *Normal*, letzteres unter weiterer Bestrahlung wieder *eosin* geben konnte.

Genmutation, meistens direkt zu *white*, ( $W \rightarrow w$ ) wird häufiger ausgelöst als Rückgenmutation.

In der Richtung von *Normal* zu *white* sinkt die Mutabilität; die helleren Allele scheinen stabiler als das normale W-Allel zu sein. Interessant war die Erscheinung, dass zwei normale W-Allele verschiedene Mutabilität aufweisen konnten.

In den Versuchen wurde ein amerikanischer und ein russischer Stamm, mit verschiedener Mutabilität des W-Allels bezogen. Das  $W^A$ -Allel mutiert fast doppelt so häufig wie das  $W^R$ -Allel, in 75% der Fälle direkt



zu white und in 25% der Fälle zu intermediären Allelen. Bei dem  $W^R$ -Allel ist dieses Verhältnis 47% und 53%; doch gibt es keinerlei phänotypische Unterschiede zwischen den beiden Stämmen.

Durch Bestrahlung wurde eine *eosin*-Mutation des normalen  $W^R$ -Allels erzeugt; bei Rückmutation entstand nun ein  $W$ -Allel, das sich bei Weiterzuchtung als  $W^A$  erwies.

Also hat sich via *eosin* ein Mutabilitätswechsel beim normalen Allel gezeigt:  $W^R \rightarrow w^e \rightarrow W^A$ .

Die Erscheinung der Reversibilität scheint keinesfalls nur allein auf die Mutationen an diesen zwei genannten Loci beschränkt zu sein. TIMOFÉEFF-RESSOVSKY (1933) schreibt diesbezüglich: „Die extensiven Versuche (Prüfung möglichst vieler Gene) haben gezeigt, dass Rückgenmutationen wohl keine Ausnahmeerscheinungen sind.“

Weiter sei hier noch auf eine Untersuchung DEMEREC's (1937) über einige Wildstämme von *Drosophila melanogaster* verwiesen. Er stellte bei drei der 15 Stämme einen höheren — untereinander zwar differierenden — Grad der spontanen Mutabilität hinsichtlich des Auftretens von sex-linked letalen Faktoren fest.

Genau wie bei *Anthirrhinum* wird auch bei *Drosophila* unter dem Einfluss der Röntgenstrahlen die Mutationsrate beträchtlich gesteigert.

Die spontane Mutationsrate am *white*-Locus, der ziemlich mutabel ist, schätzt TIMOFÉEFF-RESSOVSKY auf 1 : 250.000 — 1 : 1.000.000; bei der Röntgenbestrahlung wird die Mutationsrate mindestens um das 200-fache gesteigert. Weiterhin haben die Untersuchungen erwiesen, dass die durch Bestrahlung auftretenden Mutationen völlig mit den spontanen identisch sind. Unter dem Einfluss der Bestrahlung wird das Verhältnis, in welchem die verschiedenen Mutationen „spontan“ auftreten nicht beeinflusst, d.h. diejenigen Mutationen, die wir spontan am meisten antreffen, sind auch nach der Bestrahlung am zahlreichsten. Nicht nur die Röntgenbestrahlung, sondern auch hohe Temperatur verursacht bei *Drosophila* eine Steigerung der Mutationsrate.

PLOUGH und IVES (1934, 1935) stellten fest, dass beim Züchten bei einer subletalen Temperatur von 36° C die Zahl der Genmutationen ungefähr 6 mal so gross war als bei den Kontrollen.

Es zeigte sich indessen, dass ausser diesen Mutationen, die sowohl von ♂♂ als auch von ♀♀ vererbt wurden, unter dem Einfluss der Temperatur auch die Anzahl der nicht-genetischen, somatischen Variationen (Modifikationen) zugenommen war. Diese Modifikationen korrespondierten phänotypisch mit den am meisten frequent vorkommenden



Mutationen. Kennzeichnend war, dass sie nur von ♀♀ vererbt wurden und keine bleibende Variationen waren. Deshalb schliessen PLOUGH und IVES, dass die genannten Modifikationen das Resultat eines Temperatureffekts auf das Zytoplasma sind, wobei die Veränderungen vom Ei und nicht vom Spermia übertragen werden.

Auch BUCHMANN und TIMOFÉEFF-RESSOVSKY (1936) haben unter dem Einfluss einer Temperatur„shock“ im Larven- und Imagostadium eine Steigerung der Rate der geschlechtsgebundenen Mutationen beobachtet.

Von weiteren Beispielen experimenteller Mutationsauslösungen werde ich absehen; zusammenfassend kann man sagen, dass künstliche Mutationserzeugung bei höheren Lebensformen eindeutig und erfolgreich erzielt worden ist und dass äussere Reize beim Auftreten von Genmutationen eine wichtige Rolle spielen. Weiter ist aus dieser Übersicht zur Genüge hervorgegangen, dass unter dem Einfluss bestimmter Reize derartige Mutationen oft auch wieder ganz oder teilweise rückgängig gemacht werden.

Jetzt werde ich mich als Ziel stellen alle übereinstimmenden Punkte, welche zwischen den obengenannten Erscheinungen und denen der Dissoziation bei Bakterien bestehen, aufzusuchen und nebeneinander zu stellen.

#### § 4. ÜBEREINSTIMMENDES IN DEN ERSCHEINUNGEN, DIE EINERSEITS BEI DER GENMUTATION BEI HÖHEREN LEBENSFORMEN, ANDERERSEITS BEI DER DISSOZIATION VON BAKTERIEN AUFTRETEN.

Für die Dissoziationserscheinungen, welche hier zitiert werden, sei auf die Zusammenfassung in Kapitel X und auf meine eigenen Befunde in Kapitel XI verwiesen.

Hierunten werden für die Bezeichnung: Dissoziation, Mutation bei *Drosophila* und Mutation bei *Anthrithinum* die Abkürzungen: Diss., Mut. D., Mut. A. gebraucht.

Eine Vergleichung der Erscheinungen untereinander, zeigt uns nun die folgenden Analogien.

1. Ein direkter Übergang eines Typus in einen zweiten, extrem variierten Typus.

Diss.:  $S \rightarrow R$ ,  $M \rightarrow S$ . Der letztere Fall gilt z.B. für *Pneumococcus* und *Pneumobacillus*. Bei *Betabacterium vermiforme* der plötzliche Übergang:  $S \rightarrow R_E$  und  $R \rightarrow S$ .

Mut. D.:  $F \rightarrow f$ ,  $W \rightarrow w$ . Es treten Tiere mit „forked“ Borsten oder weissen Augen auf.

2. Indirekter Übergang von einem Typus in einen zweiten Typus über eine oder mehrere intermediäre Formen.

*Diss.*:  $S \rightarrow O \rightarrow R$ . *Escherichia* (TORREY und MONTU, 1936);  $M \rightarrow I_c \rightarrow S$ . Beim Typus I *Pneumococcus* können 5 intermediäre Formen auftreten (BLAKE und TRASK, 1933). Bei *Betabacterium vermiforme*:  $R \rightarrow O \rightarrow S$ ;  $R' \rightarrow S' \rightarrow S$ .

*Mut. D.*:  $w \rightarrow w^e \rightarrow W$ . Indirekte Mutation der Augenfarbe von *white* via *eosin* zu *Normal* (rot). Hier sind eine Reihe von intermediären Formen bekannt (*white*-Serie).

3. Direkter Übergang zwischen zwei Typen in beide, einander entgegengesetzte Richtungen.

*Diss.*:  $S \rightleftharpoons R$ ,  $M \rightleftharpoons S$ ,  $S \rightleftharpoons G$ . Bei *Betabacterium vermiforme*:  $S \rightleftharpoons O$ .

*Mut. D.*:  $F \rightleftharpoons f$ ; Hin- und Rückmutation am *forked*-Locus.

Sowohl bei der *Diss.* als auch bei der *Mut. D.* gilt die Reversibilität auch für die intermediären Formen.

*Diss.*:  $O \rightleftharpoons S$ . (TORREY und MONTU, 1936);  $I_c \rightleftharpoons M$  (BLAKE und TRASK, 1933).

*Mut. D.*:  $W \rightleftharpoons w^e$ . Hin- und Rückmutation am *white*-Locus, *eosin*  $\rightleftharpoons$  *Normal*.

Es ist hinsichtlich Punkt 3 einleuchtend, dass die Aussage VAN LOGHEM's, dass reversible Veränderungen nichts mit dem Genotypus zu tun haben können, jeden Grund verliert.

4. Der Übergang ist in der einen Richtung frequenter als in der anderen.

*Diss.*: Im allgemeinen findet  $S \rightarrow R$ -Übergang leichter und frequenter statt als die Reversion  $R \rightarrow S$ . Die unstabilen R- und R'-Typen von *Betabacterium vermiforme* bilden in dieser Hinsicht eine Ausnahme.

*Mut. D.*:  $W \rightarrow w$ . Mutation von *Normal* zu *white* ist frequenter als die Rückmutation von *white* zu *Normal* ( $w \rightarrow W$ ).

5. Eine Variante, die unter dem Einfluss bestimmter äusserer Bedingungen aufgetreten ist, kann unter denselben Bedingungen revertieren zur Ausgangsform.

*Diss.*:  $S \rightleftharpoons R$ , z.B. bei rascher, täglicher, Überimpfung in Bouillon, bei der Züchtung in grossen Mengen Bouillon, bei der Züchtung von *Mycobacterium* der Rattenlepra, auf PETROFF's Nährboden (Seite 114).

*Mut. D.*:  $F \rightleftharpoons f$ ,  $W \rightleftharpoons w^e$ . Hin- und Rückmutation treten beide unter dem Einfluss der Röntgenbestrahlung auf.

6. Bei der Dissoziation können unter dem Einfluss von verschiedenen

Agentien, wie z.B. Veränderung des pH, Hinzufügen von Chemikalien zu den Nährmedien, altern lassen der Kulturen, Kultur in Antiserumbouillon, Tierpassage usw. die gleichen Variantentypen zum Vorschein kommen, m.a.W. es besteht kein direkter Zusammenhang zwischen der Art der Variante und des äusseren Agenzes unter welches sie auftritt. (Seite 114).

Bei *Drosophila* und *Anthirrhinum* zeigen sich spontan und unter dem Einfluss verschiedener induzierender Agentien ebenfalls die gleichen Mutanten.

7. Das Altern von Bouillon- und Agarkulturen ist für die Dissoziation ein äusserst wichtiges Induktionsmittel zur Erzielung verschiedener Varianten; vergl. u.a. *Betabacterium vermiforme*.

*Mut. A.*: in diesem Zusammenhang ist die grosse Steigerung der Mutationsrate beim Altern der *Anthirrhinum*-Samen sehr bemerkenswert. Schon EISENBERG (1912) hat auf diese Analogie gewiesen: „Interessant ist die Feststellung von DE VRIES, dass das Altern der Samen die Chancen des Erscheinens von Mutanten erhöht, ebenso, wie bei der *Cholera* die Aussaat aus älteren Kulturen mehr dunklere Kolonien ergab, als diejenige aus jüngeren.“

8. Bei der Bakterien-Dissoziation ist die Erscheinung wohl bekannt, dass der S  $\rightarrow$  R-Übergang nicht immer im Auftreten der meist extremen R-Form resultiert, sondern dass auch wohl R-Formen entstehen können, welche in kolonie- bzw. zellmorphologischer Hinsicht weniger typisch, also nicht „extrem“ sind („roughness“ in verschiedenem Grad — siehe HADLEY 1937, Seite 149 —; vergl. auch die beiden R<sub>E</sub>-Typen, welche bei *Betabacterium vermiforme* aufgetreten sind).

Sehr beachtenswert ist es, dass die genannte Erscheinung seine Analogie findet bei der *Mut. D.*

PATTERSON und MULLER (1930) berichten, dass sie ausser ausgesprochenen *forked*-Mutanten in ihren Versuchen einmal eine weniger charakteristische, nicht extreme, sog. *weakly forked*-Mutante erhielten.

*Diss.*: S  $\rightarrow$  R („roughness“, nicht extrem).

*Mut. D.*: F  $\rightarrow$  f<sup>w</sup>.

9. Ebenso kennt man bei der Dissoziation die Erscheinung, dass die Reversion von R nicht in der S-Form, von welcher man ausgegangen ist, resultiert. Eine „partielle“ Reversion kann z.B. morphologisch zum Ausdruck kommen; dann zeigt die neu aufgetretene Form grössere oder kleinere Unterschiede mit der ursprünglichen S-Form.



Bei *Betabacterium vermiforme* war die partielle Reversion ( $R \rightarrow A$ ) noch ziemlich weit vom Ziel entfernt.

MACKENZIE c.s. (1935) erhielt bei der partiellen Reversion von *Shigella paradysenteriae* u.a. eine S-Form, die eine „slight roughening“ der Oberfläche zeigte. Vergl. auch die Reversion  $R_E^\circ \rightarrow S$  bei *Betabacterium vermiforme*, wobei die erhaltene S-Form in zellmorphologischer Hinsicht nur noch einen geringen Unterschied mit der Ausgangsform aufwies. Analog hiermit könnte man die von PATTERSON und MÜLLER beobachteten *very weakly forked* Mutante von *Drosophila* betrachten. Dieser Mutantentypus trat bei einer Reversion *forked*  $\rightarrow$  *Normal* auf und war noch im Besitz einer „forked“ Borste.

Auch die genannten Autoren sprechen hier von einer „partiellen“ Reversion.

10. Das Auftreten von Varianten bei der Dissoziation, z.B. von R aus S, braucht nicht immer einen plötzlichen Charakter zu tragen. In diesem Zusammenhang verweise ich auf jene Fälle, wobei graduelle Konversion von einer S- in eine R-Form zustande gebracht werden konnte. In einem solchen Fall sehen wir, dass bei fortgesetzter Züchtung mit gleichzeitiger Selektion nach „roughness“ der mehr oder weniger labilen Variantenkolonie schliesslich eine extreme und stabile R-Form zu erhalten ist.

ROEKEL und RETTGER (1936) konnten bei Stämme von *Salmonella pullorum*, welche auf Platten S-, R- und intermediäre Kolonietypen zur Entwicklung brachten, durch fortgesetzte Selektion der rauhsten Formen, einen extremen, stabilen R-Stamm erhalten.

Als einen hiermit analogen Fall könnte man an das Resultat der Selektion bei *Oenothera biennis cruciata* denken. Wir sahen doch, dass OEHLKERS (1930, 1935) bei der Selektion auf das inkonstante *cruciata*-Merkmal, wovon die Ausprägungsstärke infolge kleiner Mutationen von beinahe rein sepaloïd bis beinahe normal variierte, auf diese Weise durch progressive Mutation beinahe rein sepaloïde Formen erhalten konnte (Seite 163).

Es zeigt sich also, dass man mit Hilfe der Selektion bei labiler Genmutation, welche sich kennzeichnet durch das Auftreten von vielen kleinen Variationen in beiden Richtungen, die Veränderungen des Geno- und Phänotypus auf mutativer Basis progressiv verlaufen lassen kann.

11. Weiterhin muss auf die, bei der Dissoziation sehr allgemein vorkommende, Erscheinung von Unterschieden in der Stabilität bei den verschiedenen Stämmen einer und derselben Bakterienart gewiesen werden.

Etwas Ähnliches finden wir im Prinzip auch bei den höheren Organismen (*Drosophila*). Es sei auf die Untersuchungen DEMEREC's (1937) verwiesen, der bei einer Anzahl von Wildstämmen Unterschiede in der Mutabilität beobachtete.

Es sei auch an den Mutabilitätsunterschied hinsichtlich der Augenfarbe zwischen einem russischen und einem amerikanischen Stamm erinnert und an die Erfahrungen TIMOFÉEFF-RESSOVSKY's (1935), welcher von einem rotäugigen Stamm ausging und via die Hin- und Rückmutation der Augenfarbe (bis eosin) einen normalen Stamm erhielt, der hinsichtlich der Augenfarbe um die Hälfte weniger stabil (ungefähr zweimal so mutabel) war als die ursprüngliche Ausgangsform ( $W^R \rightarrow w^2 \rightarrow W^A$ ).

12. Schliesslich sei noch auf die Pseudo-Dissoziation gewiesen, z.B. auf das Auftreten von *pseudo-roughness* und *pseudo-smoothness* bei Kolonien unter bestimmten Bedingungen (PAUL und MALLMANN, KNAYSI, Seite 106-107). Pseudo-Dissoziation in physiologischer Hinsicht — Bildung von gelbem Pigment — hat sich bei *Bac. megatherium* gezeigt.

Wenn wir uns bezüglich der Erscheinungen der Dissoziation auf die Theorie der Genmutation einstellen, dann kann also gesagt werden, dass bei Plattenkulturen die Möglichkeit für das Auftreten von Varianten (Modifikationen), welche phänotypisch eine Übereinstimmung mit Mutanten zeigen, besteht. In dieser Formulierung scheint mir ein Hinweis auf die Erfahrungen, welche man in dieser Hinsicht bei höheren Organismen gemacht hat, sehr wichtig.

PLOUGH und IVES (1934, 1935) berichten, dass bei *Drosophila* mittels hoher Temperatur nicht allein Genmutationen, sondern auch Modifikationen (nicht-genetische, somatische, vorübergehende Variationen) induziert werden konnten. Diese Modifikationen stimmten mit den meist frequenten Mutanten phänotypisch überein.

GOLDSCHMIDT (1935) bezeichnet diese Varianten als „Phänokopien“. Im Hinblick hierauf scheint es mir angebracht bei der Dissoziation für die oben genannten Modifikationen, wie Pseudo-R und Pseudo-S, und die gelbe Pseudo-Variante ebenfalls den Begriff „Phänokopien“ einzuführen.

Überblicken wir diese 12 Punkte, dann kann man eine weitgehende Übereinstimmung zwischen dem Phänomen der Bakterien-Dissoziation und der Genmutation bei höheren Organismen nicht leugnen.

Im folgenden Paragraph soll nun kurz angegeben werden auf welche Weise die wichtigsten Erscheinungen der Bakterien-Dissoziation auf mutativer Basis gedeutet werden können.



§ 5. DEUTUNG DER WICHTIGSTEN ERSCHEINUNGEN DER BAKTERIEN-DISSOZIATION AUF MUTATIVER BASIS.

Allererst sei bemerkt, dass bereits BEIJERINCK (1912, B) in seiner Abhandlung „Mutation bei Mikroben“ eine wichtige Auseinandersetzung gegeben hat, bezüglich der Möglichkeit den Begriff der Genmutation auf die Bakterienvariabilität zu übertragen.

Seine Ansichten über dieses Problem gehen am besten hervor aus seinen hier zitierten Worten: „Die Genen oder Erbinheiten kommen in zwei Zuständen in den Zellen vor, nämlich als aktive Genen, welche die äusserlich wahrnehmbaren Merkmale verursachen, und als schlummernde oder Progenen, welche den Erscheinungen der Mutabilität und des Atavismus zugrunde liegen, indem sie dabei in aktive Genen übergehen. In gewissen Fällen hat man genügend Ursache anzunehmen, dass die Genen so zu sagen als „Protoplasma Keime“ aufgefasst werden können und durch ihre Vermehrung die für die verschiedenen Mikroben eigentümlichen, den verschiedenen Funktionen entsprechenden Protoplasmaarten erzeugen. Hierbei muss also weiter geschlossen werden, dass es so viele Genen und also auch verschiedene Protoplasmaarten in einer Zelle oder einem Mikroben giebt, wie darin von einander unabhängig erbliche Eigenschaften vorkommen. So muss in *Bacillus prodigiosus* die rote Farbe abhängig sein von wahrscheinlich vier oder fünf verschiedenen Genen, welche bei ihrer Vermehrung das „Chromoplasma“ hervorbringen, das seinerseits den roten Farbstoff produziert. Dass hierbei mehr wie eine einzige Gene in Betracht kommt, muss geschlossen werden aus dem Umstande, dass die Farbe von *Bac. prodigiosus*, wenn man alle die von dieser Bakterie erhaltenen und deutlich unterscheidbaren Farbmутanten in Bezug nimmt, in fünf, und wenn man auch die gänzlich ungefärbte Mutante dazuzählt, in sechs Farbnuancen vorkommt . . . .

Das Gärvermögen muss von einer anderen Gene, oder vielleicht von einer anderen Genengruppe, wie die die Farbe bedingende abhängen. Wieder eine andere Gene oder Genengruppe muss in der Schleimmутante, *Bac. prodigiosus viscosus*, vorkommen . . . .

Auf diese Weise kann man weiter schliessen und für jede bemerkbare und unabhängig veränderliche Eigenschaft bestimmte Genen annehmen . .

Zwar hat die Genentheorie für die Mikroben noch keine besondere Wichtigkeit erlangt. Da dieses wohl der Fall ist für die höheren Organismen, muss angenommen werden, dass beim weiteren Studium der Mikrobenvariabilität die Fruchtbarkeit dieser Theorie sich ebenfalls herausstellen wird . . . . Nach der Genentheorie kann angenommen werden,



dass sowohl bei der Mutation wie beim Atavismus <sup>1)</sup> Progenen in aktive Genen, und umgekehrt Genen in Progenen verwandelt werden."

Es ist einleuchtend, dass eine Theorie der Genmutation zur Erklärung der Bakterienvariabilität, wie eine solche heutzutage auf der modernen Mutationslehre bei höheren Organismen basiert werden könnte, im Prinzip noch völlig dem Grundgedanke BEIJERINCK's entspricht.

Wir werden nun hierunten versuchen, die Entstehung der wichtigsten Formen im Dissoziationsmuster auf mutativer Basis zu diskutieren.

#### *Die Zellmorphologie.*

Da ein Unterschied in der Zellmorphologie mit einem Unterschied im Aussehen der Kolonien zusammengeht, wobei dann die R-Kolonien meistens längere Zellen, Fäden oder Ketten besitzen, wollen wir der Einfachheit halber die Ausdrücke R und S für die Charakterisierung der Zellmorphologie gebrauchen (längere Zellen bzw. kürzere Zellen).

Die Anwendung der Mutationstheorie auf zellmorphologische Variationen werde ich an der Hand von *Betabacterium vermiforme* veranschaulichen.

Ausser den extremen Variationen in der Zellmorphologie, in den S- und R<sub>E</sub>-Formen verkörpert, kommt zellmorphologisch auch eine Anzahl Zwischenformen vor.

In Übereinstimmung mit dem multiplen Allelomorphismus bei der Genmutation höherer Organismen, will ich die zellmorphologische Variation als Mutation, bedingt durch eine Serie von multiplen Allelen (z.B. als die Zell-Serie zu bezeichnen), betrachten <sup>2)</sup>. Bei der Zellform des S-Typus gehört z.B. das Allel Z und bei den Zellen des R<sub>E</sub>-Typus, das Allel z. Die zellmorphologisch intermediären Formen werden dann durch die Allele z<sub>1</sub>, z<sub>2</sub>, z<sub>3</sub> usw. bedingt.

Bei der Mutation des Allels Z (mit oder ohne Übergang via z<sub>1</sub>, z<sub>2</sub>, usw.) zum Allel z, nimmt die Länge der Zelle zu. Da sich in mehreren Typen

<sup>1)</sup> Rückmutation (M).

<sup>2)</sup> Es muss hier betont werden, dass beim Diskutieren von Genmutation bei Bakterien die Ausdrücke „multipler Allelomorphismus und Allele“ nicht buchstäblich aufgefasst werden dürfen, wenn wir uns für die Bakterien vorläufig einstellen auf den Besitz nur eines Chromosoms (BADIAN). Die Ausdrücke haben strikt genommen nur Gültigkeit bei Anwesenheit von einem Paar homologer Chromosomen.

Bei der hierunterfolgenden Diskussion der möglichen Bedeutung des gut begründeten Prinzips der quantitativen Mutation — Mutation infolge welcher ein Gen quantitative Abänderungen erfährt — für die Bakterienveränderlichkeit habe ich jedoch gemeint einfachheitshalber die obengenannte Terminologie beibehalten zu dürfen.

von Variantenkolonien, die zu dem betreffenden Allelen der Serie gehören, die Abmessungen der Zellen sich in weiten Grenzen bewegen können, muss man sich zum besseren Verständnis eines Gens für die Zellmorphologie, auf das für die Variante zellmorphologische Charakteristikum (Kap. XI, § 7) beschränken. Jeder Mutant-Allelomorph für die Zellmorphologie vergegenwärtigt also ein bestimmtes zellmorphologisches Charakteristikum. Will man Einfachheit halber für jedes Allel nur eine einzige Zahl gebrauchen, so ist der mittlere Wert des betreffenden zellmorphologischen Charakteristikums zu nehmen, z.B. für das Z-Allel (S-Typus)  $2,5 \mu$  und für das z-Allel ( $R_E$ -Typus)  $\pm 30 \mu$ . Wenn man nun zum besseren Verständnis alle Allele der Z-Serie einen zellmorphologischen Durchschnittswert vergegenwärtigen lässt, muss die bei jedem Variantentypus gehörende Pleomorphie der Zellen als die „Modifikationszone“ aufgefasst werden, also als das phänotypische Variationsgebiet des betreffenden Allels. Diese Modifikation, für Z von  $1-15 \mu$  und für z von  $2,5-125 \mu$ , könnte man mit den Modifikationen bei reinen Linien höherer Pflanzen vergleichen (JOHANNSEN).

Für die obengenannte Auffassung spricht, dass, dem Anschein nach, jede Zelle einer S-Kolonie und jede Zelle einer  $R_E$ -Kolonie, unabhängig von seiner individuellen Länge, immer wieder eine S- und  $R_E$ -Kolonie mit nahezu demselben Modifikationsgebiet und, schätzungsweise, dasselbe zellmorphologische Charakteristikum zur Entwicklung bringt.

Da man die Dissoziation von kurzen in längere, sehr lange und fadenförmige Zellen und die Kettenbildung als das Resultat einer länger oder kürzer hinausgeschobenen Zellteilung bzw. einer ausbleibenden Zellablösung auffassen muss, hat man sich das genannte Gen für die Zellmorphologie etwa als ein Gen vorzustellen, wobei das normale Allel eine rege Septierungskapazität bzw. Zellablösung bedingt, welche Vorgänge unter dem Einfluss der verschiedenen Mutant-Allelomorphen mehr oder weniger verzögert werden. Wir erinnern noch daran, dass im allgemeinen sich die Mutation von S nach R sowohl plötzlich als auch über intermediäre Formen vollziehen kann ( $S \rightarrow R$ ;  $S \rightarrow O \rightarrow R$ ). Diese plötzliche und etappenweise Mutation kennt man auch bei *Drosophila* ( $F \rightarrow f$ ;  $W \rightarrow w$ ;  $w \rightarrow w^e \rightarrow W$ ). Für die weiteren Analogien mit der Mutation bei höheren Organismen verweise ich nach den verschiedenen in § 4 genannten Punkten.

Reversion von zellmorphologischen Abänderungen ( $R \rightarrow S$ ;  $O \rightarrow S$ ) können in Übereinstimmung mit den Erscheinungen ohne weiteres als Rückmutationen betrachtet werden. Die bei der Dissoziation nicht unbe-



kannte Erscheinung der partiellen Reversion, könnte ebenfalls auf mutativer Basis beruhen (*Drosophila*).

Zusammenfassend scheint es durchaus möglich die Variationen und Reversionen in der Zellmorphologie als Hin- und Rückgenmutationen zu betrachten.

#### *Wandstoffbildung und Vitalitätsherabsetzung.*

Im Anschluss an die S- und R-Formen und ihre Intermediäre, wollen wir noch versuchen das Auftreten von M- und G-Formen, welche nach HADLEY (1937) am Dissoziationsmuster teilnehmen können, ebenfalls auf mutativer Basis zu deuten.

#### *M-Form.*

In der kurzen, in Kapitel X, gegebenen Übersicht haben wir gesehen, dass die M-Form, die bei verschiedenen Bakterienarten auftreten kann, seine Aufnahme als dritter Typus im Dissoziationsmuster seinem mukoiden Charakter, entweder durch die Bildung eines dünnen Schleims oder einer Kapsel um die Zellen, verdankt.

Dieser Typus, der aus der S-Form zu entstehen pflegt, weicht zellmorphologisch oft wenig oder gar nicht von der S-Form ab. In solchen Fällen muss also M als eine Variante von S in *physiologischer* Hinsicht (durch seine Wandstoffbildung) betrachtet werden.

Es scheint nun sehr annehmbar das Auftreten der genannten physiologischen Eigenschaft der Mutation eines Gens zuzuschreiben; wir können die betreffenden Allele z.B. als M, das Allel der Ausgangsform (des schleimlosen S-Typus) und m, das Allel der mukoiden Mutante (des M-Typus) bezeichnen.

Auch hier scheint multipler Allelomorphismus vorzukommen; ich verweise in diesem Zusammenhang auf die durch BLAKE und TRASK (1933) festgestellten, intermediären Formen zwischen M und S beim Typus I *Pneumococcus*.

Die Mutationstheorie lässt erwarten, dass eine Mutation von M zu m nicht nur beim Vorhandensein des z-Allels, sondern auch bei Anwesenheit des z-Allels möglich sein muss.

Das Auftreten von mukoiden R-Formen, also Formen, bei welchen die für R charakteristischen Zellen von Kapseln umgeben sind, wird von diesem Gedankengang heraus vollkommen begreiflich. Auch hier ist wie bei der Zellmorphologie, eine Rückmutation ( $m \rightarrow M$ ) möglich.

Als Beispiel einer Bakterienart mit einer mukoiden S- als auch mukoiden R-Form nenne ich *Serratia marcescens* (REED, 1937).



*G-Form.*

Zur Erklärung der G-Form müssen wir uns vor Augen halten, dass es sich hierbei um eine Zwergkolonief orm handelt, welche offenbar einer Vitalitätsherabsetzung des Bakteriums zuzuschreiben ist (langsame Vermehrung und Entwicklung der Zellen).

Bei den glatten G-Kolonien scheinen die Zellen jedoch durchwegs keine auffällige Unterschiede in der Morphologie mit jenen des S-Typus aufzuweisen (*Eberthella dysenteriae* SONNE, KOSER und DIENST, 1934; *Staphylococcus aureus*, SWINGLE, 1935).

Hinsichtlich der Entstehung des G-Typus könnte man z.B. denken an eine semi-letale Mutation des vitalen S-Typus. Es scheint nicht ausgeschlossen zu sein, dass eine solche semi-letale Mutation auch beim R-Typus auftreten kann. HADLEY (1931) hat z.B. einmal bei *Bac. dysenteriae* SHIGA rough-G-Kolonien beobachtet. Im allgemeinen kann auch beim G-Typus wieder, dem Anschein nach, entweder direkt oder über intermediäre Formen, Rückmutation des semi-letalen Faktors auftreten.

Zusammenfassend können wir also feststellen, dass die Entstehung der Varianten, die HADLEY (1937) als die Hauptelemente des Dissoziationsmusters betrachtet, mit Erfolg auf Mutation von verschiedenen Genen oder Genkomplexen zurückzuführen ist, wobei die Gene unabhängig von einander mutieren.

Es kommt mir vor, dass man im Anschluss an BEIJERINCK für die ganz oder gelegentlich unabhängig variierenden physiologischen Eigenschaften wie die Virulenz, Beweglichkeit, biochemisches Verhalten (Säure- und Gasbildung aus Zuckerarten), Schleimbildung, Pigmentbildung ohne Bedenken das Bestehen gesonderter Gene oder Genkomplexe annehmen kann.

Auch hier sollte dann Hin- und eventuell Rückmutation, sowohl unabhängig als auch koordiniert mit anderen Mutation(en) auftreten können.

Wegen der Möglichkeit zur unabhängigen Variation der Beweglichkeit muss man auch hier an ein gesonderetes Gen oder Genkomplex denken. Bezeichnen wir das normale Allel (mit Flagellen) als F und das Mutant-Allel (ohne Flagellen) als f, dann muss der Beweglichkeitsverlust auf die Genmutation  $F \rightarrow f$  zurückgeführt werden. ( $H \rightarrow O$ -Form bei *Bac. proteus*, *Bac. typhosus*); Rückmutation  $f \rightarrow F$  ist nicht unmöglich.

Beim Verlust des Vermögens zur Dextranbildung aus Saccharose bei *Betabacterium vermiforme* kann man ebenfalls an die Mutation eines Gens denken, wobei unter dem Einfluss der betreffenden Allele, z.B. D und d,

einerseits Dextranbildung aus Saccharose, andererseits keine solche stattfinden kann. Eine Rückmutation  $d \rightarrow D$  (also eine Rückkehr des Dextranbildungsvermögens) wurde bis jetzt nicht beobachtet.

Es kann an dieser Stelle bemerkt werden, dass im Hinblick auf die ständige Abspaltung von zellmorphologisch abgeänderten, nicht-dextranbildenden Varianten bei der Züchtung auf Nährböden die R- und R'-Formen von *Betabacterium vermiforme* als „eversporting varieties“ zu charakterisieren sind.

Auch die z.B. von DESKOWITZ beschriebenen unstabilen Varianten kommen für eine ähnliche Bezeichnung in Betracht.

Der Verlust oder die Abänderung der Farbe kann ebenfalls als Folge einer Genmutation betrachtet werden.

Als Beispiel einer Variation der Farbe verweise ich abermals auf die Untersuchung REED's (1937), der bei *Serratia marcescens* neben der ursprünglichen roten Farbe, orange-rote und farblose Varianten erhielt. Wahrscheinlich haben wir auch hier ein Beispiel von multiplem Allelomorphismus, eine Ansicht, welche sich nahe an den Gedankengang BEIJERINCK's anlehnt. Dieser Forscher doch vermutete im Zusammenhang mit den bei *Bac. prodigiosus* (= *Serratia marcescens*) beobachteten Farbenübergängen, dass bei der Farbe etwa 4 bis 5 verschiedene Gene eine Rolle spielen. In Übereinstimmung mit der *white*-Serie bei *Drosophila* könnte man hier von einer *white*-Serie mit den Allelen  $W(\text{rot}) - w^{\text{or}}(\text{orange-rot}) - w(\text{weiss})$  sprechen. REED (1937) konnte in seiner Untersuchung nur die Mutation ( $W \rightarrow w^{\text{or}} \rightarrow w$  und  $W \rightarrow w$ ) feststellen und keine Rückmutation, während BEIJERINCK diese wohl beobachtete.

Den gegebenen Auseinandersetzungen ist zu entnehmen, dass eine Theorie, welche für die höheren Organismen ausreichend experimentell gestützt worden ist, auch die wichtigsten Dissoziationserscheinungen ungezwungen zu beschreiben vermag.

Die Annahme der *Genmutationstheorie* für die Deutung der Dissoziationserscheinungen bringt, kurz zusammengefasst, die nachstehenden Konsequenzen mit sich:

1. Es können beträchtliche Unterschiede in der Mutabilität der Gene vorhanden sein; dadurch wird das Bestehen von labilen und mehr oder weniger stabilen Formen begreiflich. Rückmutation ist eine oft vorkommende Erscheinung; ihr Auftreten kann allerdings unterbleiben oder mit Hilfe eines besonderen Agenzes, und dann zuweilen noch mit vieler Mühe, zustande gebracht werden.



2. Die Mutation der Gene kann quantitativer Natur sein (multipler Allelomorphismus).

3. Für das Eintreten der Mutation, auch bei Bakterien, sind in hohem Masse die äusseren Bedingungen verantwortlich zu machen. Man muss sich vor Augen halten, dass auch beim sogen. „normalen“ Züchten die Milieufaktoren, wie die fortwährend wechselnden Bedingungen der Nahrung, der Abscheidung von Stoffwechselprodukten usw. eine sehr wichtige, aber nicht näher zu analysierende, Rolle spielen. Diese Ansicht wird stark gestützt durch die Tatsache, dass eine absichtliche Einwirkung sehr verschiedener äusserer Faktoren, wie pH-Veränderung, Hinzufügung von Chemikalien zum Nährmedium, Temperaturänderung, altern lassen der Zellen in ihrem Milieu, Züchtung in homologem Antiserum, Einwirkung des Bakteriophagen, Tierpassagen usw. das Auftreten von Mutationen meistens stark befördert.

Ein solches bewusstes Forzieren von Mutationen, wobei Typen entstehen, welche allerdings in nichts von den unter sogen. „normalen“ Bedingungen auftretenden Mutationen zu unterscheiden sind, steht mit den Befunden an höheren Organismen im Einklang (Siehe § 3).

4. Ein anderer wichtiger Punkt bezieht sich auf die Frage, warum beim Mutationsphänomen der *Bakterien*, im Vergleich mit dem der *höheren Organismen*, eine „mangelhafte“ Stabilität und eine damit gepaart gehende Reversibilität so stark in den Vordergrund tritt und warum bei den *Bakterien* so oft abweichende Bedingungen die Mutation mehr oder weniger zu stimulieren vermögen.

Obwohl auf diese beiden eng miteinander verbundenen Fragen natürlich keine endgültige Antwort zu geben ist, will ich darauf hinweisen, dass bei den höheren, mehrzelligen Organismen die somatischen und generativen Zellen, in welchen sich in einer bestimmten Entwicklungsphase eine Genmutation vollzieht, durch den komplexen, differenzierten Bau dieser Organismen nicht oder in viel geringerem Masse als die Bakterienzellen dem Einfluss der Aussenwelt ausgesetzt sind.

Auf jede Bakterienzelle werden alle denkbaren, äusseren Faktoren direkt und in ihrer vollen Intensität einwirken. Bedenken wir weiterhin, dass während der Existenz einer Bakterienart an verschiedenen Orten viele verschiedene und fortwährend wechselnde äussere Faktoren in ihrem vollen Umfang die erbliche Konstitution beeinflusst haben können, dann könnte man sich vorstellen, dass der mehr oder weniger labile Charakter vieler Formen aber auch die oft vorkommenden Stabilitäts-



unterschiede bei neu isolierten Bakterienstämmen zum Teil ihrer unbekannteren Vorgeschichte zuzuschreiben ist.

5. Mutationen von verschiedenen Genen oder Genkomplexen können unabhängig voneinander stattfinden; öfters allerdings treten sie koordiniert auf.

Aus dem über die Mutationen bei höheren Organismen Mitgeteilten konnte man vielleicht den Eindruck erhalten, dass sich hier keine Korrelation der verschiedenen Mutationen zeigen kann. Jedoch ist dies nicht der Fall; es sei hier nur auf den folgenden Passus aus einem Artikel STURTEVANT's (1924) gewiesen: „one clear case of the sort of correlation discussed had been reported by MORGAN, BRIDGES and STURTEVANT (1921). A large number of small-bristled mutant types occur in *Drosophila melanogaster*, and numerous other effects — roughened eyes, long development period, female sterility etc. — are more or less regularly associated with the small bristles, though the genetic bases of the different types are quite distinct.”

Auch hier haben wir wieder eine Analogie, deren Bedeutung nicht unterschätzt werden darf.

Die Tatsache, dass bei einer bestimmten Bakterienart die Mutationen sowohl unabhängig als auch korreliert (dies letztere überwiegend) stattfinden, muss in dem besprochenen Gedankengang auf Stabilitätsunterschiede der betreffenden Gene oder Gengruppen in den verschiedenen Zellen beruhen. Wenn in bestimmten Zellen also zwei oder mehrere Gene unter dem Einfluss äusserer Faktoren gleichzeitig mutieren, dann müssen wir daraus schliessen, dass in den genannten Zellen die Stabilität der betreffenden Gene für die auf sie einwirkenden äusseren Faktoren, nicht hinreichend gewesen ist.

Im Lichte dieser Auffassung lässt sich das eher beschriebene Verhalten von *Serratia marcescens* in alten Bouillonkulturen folgendermassen interpretieren: unter den roten, nicht mukoiden Zellen (mit welchen ursprünglich geimpft wurde) können Individuen vorkommen, welche orange-rot-mukoid und weiss-mukoid sind, m.a.W. in einzelnen Individuen hat sowohl das W- als auch das M-Allel keine genügende Stabilität aufgewiesen; es gibt aber auch Zellen, bei welchen z.B. die Stabilität des W-Allels wohl, die des M-Allels nicht hinreichend war (rote-mukoide Form) und schliesslich Zellen, bei welchen keine einzige Genmutation stattgefunden hat (rote-nicht mukoide Form).

Es unterliegt übrigens wohl keinem Zweifel, dass in vielen Fällen bei der Korrelation der Genmutationen auch eine gegenseitige Beeinflussung der Gene angenommen werden muss.

## SCHLUSSBETRACHTUNG ÜBER DAS WESEN DER DISSOZIATION.

Im Kapitel X § 3 haben wir gesehen, dass zur Erklärung der Erscheinungen, welche bei der Veränderlichkeit der Bakterien auftreten, hauptsächlich drei Theorien angeführt worden sind: die Mutationstheorie, die zyklische Theorie und die Individualitätstheorie.

Im Laufe der dort gegebenen kritischen Besprechung dieser Theorien, sahen wir bereits, dass die Annahme einer der beiden letztgenannten Theorien verschiedene Schwierigkeiten mit sich bringt, während diejenigen Einwände, welche von verschiedenen Forschern gegen die Mutationstheorie erhoben wurden, keineswegs entscheidend sind.

Im Kapitel XI wurde, auf den Beobachtungen an *Betabacterium vermiforme* fussend, die Schlussfolgerung gemacht, dass auf die zyklische Theorie für die Erklärung der aufgetretenen Erscheinungen zu verzichten ist, während ausserdem darauf hingewiesen wurde, dass auch die Individualitätstheorie, wie sie von VAN LOGHEM entwickelt worden ist, nicht imstande ist, die beobachteten Erscheinungen befriedigend zu erklären.

Wir haben uns daher im Kapitel XII näher mit der Frage beschäftigt, inwieweit dann die Mutationstheorie, welche besagt, dass den Erscheinungen der Dissoziation genotypische Veränderungen zugrunde liegen, zur Erklärung herangezogen werden kann.

Im § 1 dieses Kapitels haben wir ausgeführt, dass infolge des Fehlens einer Sexualität bei Bakterien — abgesehen von einer möglichen, hier aber nicht wichtigen, azytogenen Autogamie — der experimentelle Beweis für die Annahme der Mutationstheorie zur Erklärung der bakteriellen Veränderlichkeit, nicht geliefert werden kann.

Andererseits ist jedoch betont, dass eben so wenig Argumente gegen eine derartige Annahme anzuführen sind.

Durch diese Überlegung gestützt, untersuchte ich, inwieweit die rezenten Arbeiten über die Erscheinung der Genmutation bei höheren Organismen zu Beobachtungen geführt haben, welche uns veranlassen könnten auf eine Verwandtschaft dieser Erscheinung mit jener der bakteriellen Dissoziation zu schliessen.

Wie in § 4 dieses Kapitels gezeigt worden ist, kann man zahlreiche Punkte auffinden, welche eine erstaunliche Übereinstimmung in den

äusseren Erscheinungsformen der beiden genannten Prozesse ersehen lassen.

Mit Sicherheit stellt sich aus dieser vergleichenden Untersuchung heraus, dass alle Einwände, welche frühere Forscher gegen eine Annahme der Mutationstheorie zur Erklärung der Dissoziation erhoben haben, nicht stichhaltig sind.

Wir bekennen jedoch vollauf die Unzulässigkeit, um die festgestellten Analogien als strikte Beweise für die Richtigkeit der Mutationstheorie zur Erklärung der bakteriellen Dissoziation gelten zu lassen, aber bemerken dazu, dass solche Beweise ebenso wenig für andere Theorien anzuführen sind.

Zieht man aber die vielen Stützpunkte, welche das Dissoziationsphänomen in den Erscheinungen der Genmutation bei höheren Organismen findet, in Betracht, dann möchte ich mich den Ansichten LINDEGREN's und DESKOWITZ's anschliessen und diese Arbeit beenden mit der folgenden Aussprache: die alte Ansicht von BEIJERINCK, dass der bakteriellen Veränderlichkeit eine Genmutation zugrunde liegt, besitzt einen Grad von Wahrscheinlichkeit, welche die anderen zur Zeit vertretenen Ansichten keineswegs beanspruchen können.

---



## LITERATUR.

- ARKWRIGHT, J. A., *A system of Bacteriology* 1, 311, *Medic. Res. Council.*, 1930.
- BADIAN, J., *Archiv f. Mikrobiologie* 4, 409, 1933.
- , *Acta Soc. Bot. Poloniae* 12, 69, 1935.
- , *Extr. du Bullet. de l'Acad. Polon. des Sciences et des Lettres, Série B*, 1937.
- BAERTHLEIN, K., *Centr. f. Bakt. I.* 81, 369, 1918.
- BAUR, E., *Bibliotheca genetica* 3—4, 110, 126, 1922.
- , *Indukt. Abst. und Vererbl.* LX, 467, 1932.
- BEIJERINCK, M. W., *Versl. der Afd. Natuurkunde Kon. Akad. v. Wetensch. Amsterdam* 9, 310, 1901.
- , *Folia Microbiologica* 1, 377, 1912. (A).
- , *Folia Microbiologica* 1, 4, 1912. (B).
- en L. E. DEN DOOREN DE JONG, *Versl. der Afd. Natuurkunde Kon. Akad. v. Wetensch. Amsterdam* 31, 354, 1923.
- BLAKE, G. and J. D. TRASK, *Journal of Bact.* 25, 289, 1933.
- BLUMER, S., *Centr. f. Bakt. II.* 91, 39, 1934.
- BUCHMANN, W. und N. W. TIMOFÉEFF-RESSOVSKY, *Indukt. Abst. und Vererbl.* LXXI, 335, 1936.
- CAULLERY, M., *Encyclopédie scientifique*, Paris, 1922.
- DAWSON, M. H., *Journ. Path. and Bact.* 36, 263, 1933.
- DEMEREK, M., *Genetics* 22, 469, 1937.
- DESKOWITZ, M. W., *Journal of Bact.* 33, 349, 1937.
- DONKER, H. J. L., *Diss.*, Delft 1926.
- DUBOS, R. and O. T. AVERY, *Journ. of Experim. Medicine* 54, 51, 73, 1931.
- DULANEY, A. D., *Journ. of Infect. Dis.* 42, 575, 1928.
- EISENBERG, PH., *Centr. f. Bakt. I.* 66, 1, 1912.
- ELEMA, B., *Centr. f. Bakt. II.* 72, 66, 1927.
- ENDERLEIN, G., *Bakterien-Cyclogenie*, Berlin, 1925.
- FECHNER, G., *Centr. f. Bakt. I.* 135, 487, 1936.
- FELIX, A. and L. OLITZKI, *Journ. of Hyg.* 28, 55, 1928.
- GLADSTONE, G. P., P. FILDES and G. M. RICHARDSON, *British Journ. of Experim. Pathology* 16, 335, 1935.

- GOLDSCHMIDT, R., Physiologische Theorie der Vererbung, Berlin, 1927.
- , Indukt. Abst. und Vererbl. **LIX**, 38, 1935.
- HADLEY, Ph., Journ. of Infect. Dis. **40**, 1, 1927.
- , E. DELVES and J. KLIMEK, Journ. of Infect. Dis. **48**, 1, 1931.
- , Journ. of Infect. Dis. **60**, 129, 1937.
- HARRISON, R. W., Journ. of Infect. Dis. **59**, 2, 244, 1936.
- HENRICI, A. T., The biology of Bacteria, New-York, 1934.
- HOYER, D. P., Diss., Leiden, 1898.
- JOLLOS, V., Centr. f. Bakt. I. **93**, 22, 1924.
- JONES, L. R., Journal of Bact. **25**, 97, 1933.
- KAGAN, B. et NEPOMNIASCHAIA, Ann. des Ferment. **1**, 374, 1935—1936.
- KAHN, M. C. and H. SCHWARZKOPF, Journal of Bact. **25**, 157, 1933.
- KLUYVER, A. J., Diss., Delft, 1914.
- , Festschrift S. ORLA-JENSEN, 46, 1931.
- and C. B. VAN NIEL, Centr. f. Bakt. II. **94**, 369, 1936.
- KNAYSI, G., Journal of Bact. **26**, 623, 1933.
- KOSER, S. and R. B. DIENST, Journ. of Infect. Dis. **54**, 131, 1934.
- KUCKUCK, H., Indukt. Abst. und Vererbl. **LXXI**, 429, 1936.
- KUN, L. und B. VON FENYVESSY, Centr. f. Bakt. I. **124**, 485, 1932.
- LAFAR, F., Handbuch der techn. Mykologie **5**, 256, 1905—1914.
- LI, C. P., Journ. of Experim. Medicine **50**, 255, 1929.
- LINDEGREN, C. C., Centr. f. Bakt. II. **92**, 40, 1935.
- , Centr. f. Bakt. II. **93**, 113, 1936.
- LIPPMANN, E. VON, Die Chemie der Zuckerarten I u. II, 3e Aufl., 1904.
- LOGHEM, J. J. VAN, Nederl. Tijdschrift voor Geneeskunde, 2e helft no. 25, 2981, 1921.
- , Proceedings Kon. Akad. v. Wetensch. Amsterdam **34**, 2, 1931.
- , Antony van Leeuwenhoek **4**, 113, 1937.
- LONGSWORTH, L. G. and D. A. MACINNES, Journal of Bact. **32**, 567, 1936.
- LOUWE-KOOYMANS, L. H., Diss., Amsterdam, 1930.
- LUTZ, M., Bullet. Soc. Mycol. de France **15**, 68, 1899.
- MACKENSIE, G. M., H. FITZGERALD and V. IRONS, Journal of Bact. **29**, 583, 1935.
- MALLMANN, W. L., Michigan Techn. Bulletin **122**, 3, 1932.
- MASSINI, R., Archiv f. Hygiene **61**, 250, 1907.
- MORGAN, T. H., C. B. BRIDGES and A. H. STURTEVANT, Ann. Report in Yearbook, no. **19**, 329, Carnegie Inst. of Washington, 1921.
- NEISSER, M., Centr. f. Bakt. I. **38**, Beih. 98, 1906.

- NIELSEN, N. und V. HARTELIUS, *Comptes rendus des travaux du laboratoire Carlsberg* 22, 23, 1937.
- NUNGESTER, W. J., *Journ. of Infect. Dis.* 44, 73, 1929.
- , *Journ. of Bact.* 25, 49, 1933.
- NYBERG, C., K. BONSDORFF und K. KAUPPI, *Centr. f. Bakt. I.* 139, 13, 1937.
- OEHLKERS, FR., *Zeitschr. f. Bot.* 23, 967, 1930.
- , *Zeitschr. f. Bot.* 28, 161, 1935.
- ORLA-JENSEN, S., *The lactic acid bacteria*, 1919.
- , N. C. OTTE and A. SNOG-KJAER, *Mémoires de l'Académie Royale des Sciences et des Lettres de Danemark. 9me Série*, 6, No. 5, 1936.
- PATTERSON, J. T. and H. J. MULLER, *Genetics* 15, 495, 1930.
- PAUL, J. R., *Journ. of Experim. Medicine* 46, 1927.
- PIETSCHMANN, A., *Archiv f. Mikrobiologie* 2, 310, 1931.
- , und A. RIPPEL, *Archiv f. Mikrobiologie* 3, 422, 1932.
- PLOUGH, H. H. and P. T. IVES, *Proc. Nat. Acad. of Science of U. S. A.* 20, 268, 1934.
- , *Genetics* 20, 42, 1935.
- PORCHET, B., *Mitteil. Lebensmittelunters. u. Hygiene* 25, 235, 1934.
- REED, G. B., *Journal of Bact.* 34, 255, 1937.
- REIMANN, H. A., *Journ. of Experim. Medicine* 41, 587, 1925.
- , *Journ. of Experim. Medicine* 49, 237, 1929.
- , *Journal of Bact.* 33, 499, 513, 1937.
- REINKE, J., *Jahrb. f. wissensch. Bot.* 26, 495, 1894.
- ROEKEL, H. and L. F. RETTGER, *Journ. of Infect. Dis.* 58, 172, 1936.
- ROELOFS, E. T., *Diss., Groningen*, 1937.
- SACCHETTI, M., *Centr. f. Bakt. II.* 95, 102, 1936—1937.
- SCHACHNER, J., *Centr. f. Bakt. II.* 76, 328, 1928—1929.
- SCHARDINGER, F., *Centr. f. Bakt. II.* 14, 772, 1905.
- SICKLES, G. M. and M. SHAW, *Journ. of Infect. Dis.* 53, 38, 1933.
- , *Journ. of Bact.* 28, 415, 1934.
- SIRKS, M. J., *Handboek der Algemeene Erfelijkheidsteorie* 1933.
- SMIT, J., *Folia Microbiologica* 5, 41, 1919.
- SOETERS, K., *Ann. des Ferment.* 2, 6, 1936—1937.
- SOULE, M. H., *Journ. of Infect. Dis.* 42, 93, 1928.
- STELLING-DEKKER, N. M., *Diss., Utrecht*, 1931.
- STEVENS, F. A., *Journ. of Infect. Dis.* 57, 275, 1935.
- STILLE, B., *Archiv f. Mikrobiologie* 8, 125, 1937.
- STUBBE, H., *Bibliographia genetica X.* 299, 1933.



- , Ind. Abst. und Vererbl. LVI, 1, 202, 1930.  
—, Ind. Abst. und Vererbl. LX, 474, 1932.  
—, Ind. Abst. und Vererbl. LXX, 533, 1935.  
STURTEVANT, A. H., Science 59, 579, 1924.  
SWINGLE, E. L., Journal of Bact. 29, 467, 1935.  
TARR, H. L. A. and H. HIBBERT, Canad. Journ. of Research 5, 414, 1931.  
TASMAN, A. und A. W. POT, Biochem. Zeitschr. 270, 349, 1934.  
TIEGHEM, Ph. VAN, Ann. Sci. Nat. Bot. Série 6, 198, 1878.  
TIMOFÉEFF-RESSOVSKY, N. W., Ind. Abst. und Vererbl. LXIV, 173, 1933.  
—, Ind. Abst. und Vererbl. LXV, 278, 1935.  
TORREY, J. C. and E. MONTU, Journal of Bact. 32, 339, 1936.  
VIERTHALER, R. W., Centr. f. Bakt. I. 139, 1, 1937.  
WARD, MARSHALL. H., Philosoph. Transact. of the Royal Soc. London,  
183, 126, 1892.  
WEBSTER, L. T. and C. BURN, Journ. of Exper. Medicine 46, 855, 1927.
-

## STELLINGEN.

1.

Het onder de benaming „Tibi” beschreven symbiotische product van een *Saccharomyces*- en een melkzuurbacterie-soort dient op grond van de gelijkheid der symbionten als identiek te worden beschouwd met de in de gistinglitteratuur veelvuldig vermelde „Ginger Beer Plant”.

2.

Op grond van talrijke analogieën tusschen de bij bacteriëndissociatie optredende verschijnselen en die, welke het recente onderzoek aangaande de mutatie bij hogere organismen heeft doen kennen, verdient onder de bestaande theorieën ter verklaring van genoemde dissociatie de mutatie-theorie de voorkeur.

3.

De verklaring van de geotropie door de combinatie van de statolieten-theorie met de groeistofleer is, in den door HABERLANDT gegeven vorm, onaanvaardbaar.

G. HABERLANDT, Sitz. Ber. d. Preuss. Akad. d. Wiss., Phys.-Math. Klasse XVII, 186, 1937.

4.

De conclusie van CLARK, dat de top van het *Avena*-coleoptiel negatief geladen is ten opzichte van meer basaal gelegen plaatsen, is niet juist.

W. G. CLARK, Plant Physiol. 12, 409, 1937.

5.

Volgens ARK is de aanwezigheid van bodembacteriën noodzakelijk bij de totstandkoming van de „little leaf” ziekte van vruchtboomen en andere gewassen. De meening van GERRITSEN, dat bacteriën een rol spelen bij de veenkoloniale haverziekte vindt in dit onderzoek naderen steun.

P. A. ARK, Americ. Soc. Hortic. Science 34, 216, 1937.

De argumenten, op grond waarvan VAN STEENIS tot een vroegere invasie van stenotherme bergplanten van Australië uit naar de Indische Archipel besluit, bieden evenzeer de mogelijkheid tot een andere en meer waarschijnlijke verklaring aangaande de tegenwoordige verspreiding der betreffende plantensoorten.

C. G. G. J. VAN STEENIS, *Bullet. du Jardin Bot. de Buitenzorg, Série III, XIII, 135, 1934.*

## 7.

De fundamenteel belangrijke onderzoekingen van WINGE en LAUSTSEN over de genetische segregatie bij *Saccharomyces*-soorten hebben de mogelijkheid geopend om een volledige analyse van het dissociatie-verschijnsel bij gistsoorten door te voeren.

O. WINGE and O. LAUSTSEN, *C. R. d. Trav. du Lab. Carlsberg, Série Physiol. 22, 99, 1937.*

## 8.

Het is denkbaar, dat voor de uiteenlopende resultaten, die eenerzijds door THOMAS en anderzijds door DOLK en VAN DER PAAUW bij de ademhaling van de regenworm bij een zuurstofspanning tusschen 15 en 20% verkregen zijn, een verklaring ontleend kan worden aan de uitkomst der onderzoekingen van HARNISCH aangaande de primaire en secundaire oxybiose van ongewervelde dieren.

O. HARNISCH, *Verhandl. d. Deutsch. Zool. Ges., 129, 1937; Zeitschr. für vergl. Physiol. 24, 387, 1937.*

## 9.

Bij de commercieele bereiding van champignonbroed verdient het aanbeveling om te zoeken naar een methode, waardoor het mogelijk wordt om in het laboratorium op kleine schaal en op korte termijn champignons te kweken, zulks ter voortdurende contrôle van de qualiteit van het te leveren broed, als mede ter nadere bestudeering van de invloed van voortgezette selectie bij de sporenwinning.











