

Copyright ©

Es gilt deutsches Urheberrecht.

Die Schrift darf zum eigenen Gebrauch kostenfrei heruntergeladen, konsumiert, gespeichert oder ausgedruckt, aber nicht im Internet bereitgestellt oder an Außenstehende weitergegeben werden ohne die schriftliche Einwilligung des Urheberrechtinhabers. Es ist nicht gestattet, Kopien oder gedruckte Fassungen der freien Onlineversion zu veräußern.

German copyright law applies.

The work or content may be downloaded, consumed, stored or printed for your own use but it may not be distributed via the internet or passed on to external parties without the formal permission of the copyright holders. It is prohibited to take money for copies or printed versions of the free online version.

Über einige sternbildende Bakterien aus der Ostsee

VON RENATE AHRENS UND GERHARD RHEINHEIMER

mit 12 Textabbildungen

Zusammenfassung: Es werden vier sternbildende Bakterienstämme aus der westlichen Ostsee beschrieben und Beobachtungen über die Ausbildung der sternförmigen Zellaggregate mitgeteilt. Ein Stamm wird zu *Agrobacterium stellulatum* STAPP und KNÖSEL gestellt, die drei anderen werden als eigene Arten abgegrenzt und dafür die Namen *Agrobacterium ferrugineum* nov. spec., *Agrobacterium luteum* nov. spec. und *Agrobacterium sanguineum* nov. spec. vorgeschlagen.

Observations on some star forming bacteria from the Baltic Sea. (Summary): Four bacteria] strains forming starlike aggregates were isolated from waters of the Western Baltic Sea. They were studied morphologically and physiologically, with special emphasis on the aggregate formation. A description of each strain is given. One belongs to *Agrobacterium stellulatum* STAPP and KNÖSEL. For three further strains the following names are proposed: *Agrobacterium ferrugineum* nov. spec., *Agrobacterium luteum* nov. spec. and *Agrobacterium sanguineum* nov. spec.

Einleitung

Bei bakteriologischen Untersuchungen in der westlichen Ostsee (RHEINHEIMER, 1966) wurden immer wieder sternbildende Bakterien gefunden. Besonders in den Wintermonaten sind diese sehr zahlreich. Da bisher nur ein sternbildendes Bakterium aus der Ordnung der Eubacteriales von einem marinen Standort beschrieben wurde — nämlich *Agrobacterium stellulatum* (STAPP und KNÖSEL, 1954), das SIEBERT und SCHWARTZ (1956) aus marinem Sediment isolierten, soll im Folgenden eine kurze Beschreibung von 4 sternbildenden Bakterienstämmen aus der Ostsee gegeben werden.

Stern- und raupenförmige Bakterienaggregate entstehen dadurch, daß sich mehrere oder viele Einzelzellen mit den Zellpolen aneinanderlagern. Diese Erscheinung wurde zuerst von BEYERINCK (1890) bei „*Bacillus radicolica*“ beobachtet und später von STAPP und BORTELS (1931) bei *Pseudomonas (Agrobacterium) tumefaciens*, dem Erreger des Pflanzenkrebses, genauer untersucht. Die Bildung von sternförmigen Zellaggregaten ist bei der Familie der Rhizobiaceae sehr verbreitet. Vor allem findet sie sich bei phytopathogenen und symbiontischen Arten. Außerdem ist sie von einigen Bodenbakterien und dem oben erwähnten marinen *Agrobacterium stellulatum* bekannt. Eine Literaturübersicht hierzu gibt KNÖSEL (1962). Die Sternbildung wird von STAPP und Mitarbeitern als Kopulationsakt gedeutet (s. STAPP und BORTELS, 1931; STAPP und KNÖSEL, 1954). Außer bei den zu den Eubacteriales gehörenden Rhizobiaceae kommen sternförmige Zellaggregate noch bei *Caulobacter* (STOVE POINDEXTER, 1964; STOVE, 1965), *Hyphomicrobium* (CONTI und HIRSCH, 1965), *Leucothrix* (HAROLD und STANIER, 1955; PRINGSHEIM, 1957) und *Spirillum* (WATANABE, 1960) vor und nach neueren Untersuchungen von GRÄF und STÜRZENHOFECKER (1964) auch bei einigen aus Süßwasser isolierten Myxobakterien. Angehörige der genannten Gattungen finden sich auch in der Ostsee — ob die Sternbildung dieser Mikroorganismen derjenigen der Rhizobiaceae gleichzusetzen ist, kann zur Zeit noch nicht übersehen werden. Deshalb galt unsere Aufmerksamkeit zunächst nur den sternbildenden Eubacteriales. Diese sind nach unseren Beobachtungen in der

westlichen Ostsee sehr verbreitet. Sie finden sich hier sowohl im Wasser als auch auf Algen und im Sediment. Sie lassen sich auf Agarplatten (ZoBell-Agar 2216 E) verhältnismäßig leicht an ihren charakteristischen Kolonien erkennen. Diese sind klein (\varnothing 0,1 bis 1,0 mm) und knopfartig und haben ein von einem helleren Saum umgebenes dunkles Zentrum. Der häufigste Typ ist dunkelbraun gefärbt. Stämme mit anders gefärbten Kolonien sind dagegen vergleichsweise selten. In den Wintermonaten enthalten die Keimzahlplatten regelmäßig 30—95% solcher braunen Kolonien, wobei die Werte selten unter 50% liegen. Diese Häufigkeit gab Anlaß zu einer eingehenderen Untersuchung dieser Bakterien. In der vorliegenden Arbeit werden zunächst zwei sternbildende Stämme mit braunen Kolonien und je einer mit roten und gelben Kolonien beschrieben.

Methodik

Die Wasserproben wurden in autoklavierten Glasflaschen mit Hilfe von ZoBell-Schöpfnern steril entnommen. Je 1 ml einer geeigneten Verdünnung wurde mit 10 ml ZoBell-Agar 2216 E in einer Petrischale vermischt. Die weitere Isolierung und Züchtung erfolgte in demselben Medium mit oder ohne Agarzusatz. Sämtliche Ansätze wurden bei Zimmertemperatur (20—22° C) bebrütet.

Die Stämme A 5, A 7 und A 61 wurden aus der Kieler Bucht isoliert (Salzgehalte von 12—25‰). Der Stamm A 91 stammt aus der Schlei, einer Förde der Ostsee (Station Lindaunis, 6—12‰ Salz).

Besonderes Schwergewicht wurde auf die morphologische Untersuchung gelegt. Hierfür stand das Mikroskop Standard GFL der Firma Zeiss mit dem Objektiv Neofluar 100 : 1, A 1.30 zur Verfügung. Die Beobachtung der Morphologie und die Vermessung der Zellen erfolgten in Lebendpräparaten unter Phasenkontrast; gefärbte Präparate wurden im Hellfeld betrachtet. Für Mikroaufnahmen fand die Kleinbild-Kassette der Firma Plaubel, Frankfurt/Main, Verwendung. Die Kamera wurde an das automatische Belichtungsgerät Mel 13 der Firma Wild, Heerbrugg/Schweiz, angeschlossen. Als Filmmaterial bewährte sich Kodak Plus-X-Pan.

Die Vorschriften für die physiologischen und biochemischen Tests wurden den folgenden Büchern und Veröffentlichungen entnommen:

- Manual of Microbiological Methods (1957): Färbungen.
ANDERSON (1962): Nitratreduktion; Oxydase-Reaktion; Katalase-Reaktion; Stärkeabbau; Wachstum in einem einfachen Stickstoff-Medium.
BRISOU & VARGUES (1963): Gelatinestich.
HAYES (1963): Ammoniak aus Pepton.
SKERMAN (1959): Harnstoffspaltung (p. 180); Lackmusmilch (p. 174); Wachstum in 1% Phenol (p. 146).
LEIFSON (1963): Verwertung von Kohlenhydraten (MOF-Medium).
Oxoid-Manual, p. 188: Indolbildung.
PFISTER & BURKHOLDER (1965): Methylrot; Voges-Proskauer.
OPPENHEIMER (1964) p. 28: Sulfatreduktion.
H₂S aus Pepton (Bleiacetatpapiermethode): Medium nach CLARKE (1953).
Zelluloseabbau (Plattentest): Medium nach OPPENHEIMER (1964), p. 17; Zellulosesuspension nach SKERMAN (1959), p. 156.

Zur Herstellung der verschiedenen Testnährböden fand ein Gemisch aus 3 Teilen gealtertem Seewasser (ZOBELL, 1946) und einem Teil dest. Wasser Verwendung. Die üblichen Tests (s. Manual of Microbiological Methods, 1957) waren auf unsere marinen

Stämme nicht ohne weiteres anwendbar, da in einigen Ansätzen kein Wachstum erfolgte. Deshalb wurden, soweit möglich, Spezialvorschriften für Meeresbakterien verwendet. Dennoch haben einige Tests nur einen geringen Aussagewert, da wegen des langsamen Wachstums die untersuchten Stoffwechselprodukte häufig unter der Empfindlichkeit der Nachweisreaktionen bleiben. So gaben einige Tests, die für die Unterscheidung raschwüchsiger Bakterien von großer Bedeutung sind, trotz langer Bebrütungszeiten durchweg negative Ergebnisse (vgl. ZOBELL & UPHAM, 1944, p. 252). In den Kohlenhydrat-Ansätzen tritt trotz guten Wachstums erst nach 8—10 Wochen eine eindeutige Reaktion ein. Sterben die Kulturen vorher ab, so ist die Säurebildung schwer festzustellen (vgl. LEIFSON, 1963).

Beschreibung der Stämme

Die Stämme A 5 und A 7 stellen zwei Typen einer Bakteriengruppe dar, die in der Ostsee sehr verbreitet ist und auf den Isolierungsplatten an den charakteristischen braunen Kolonien leicht erkannt werden kann. Bakterien dieser beiden Typen können in der westlichen Ostsee praktisch in allen Wasserproben gefunden werden; in den Wintermonaten beherrschen sie die Bakterienflora.

Die Stämme A 61 und A 91 haben gelbe bzw. rote Kolonien und kommen nur verhältnismäßig selten vor.

Gute Sternbildung kann bei allen Stämmen auf ZoBell-Agar 2216 E und in demselben Medium ohne Agarzusatz leicht erreicht werden. Schöne Präparate solcher Anordnungen werden erhalten, wenn man in eine flüssige Kultur für 24 Std. ein steriles Deckglas einhängt und dieses anschließend anfärbt oder zur Lebendbeobachtung mit einem Vaselinerand auf einen Objektträger klebt.

Stamm A 5

Gerade Stäbchen von sehr unterschiedlicher Länge. In jungen und auch in langsam wachsenden Kulturen meist kurze Stäbchen mit abgerundeten Enden von $0,4-1 \mu \times 0,6-2,5 \mu$. In rasch wachsenden oder älteren Kulturen Fadenzellen von beträchtlicher Länge (bis 50μ). Die Zelllänge ist temperaturabhängig. Selten wurden verzweigte Formen beobachtet, die dann aber die betreffende Kultur beherrschten. Kurzstäbchen können sich abrunden zu Kugelzellen. Es handelt sich dabei möglicherweise um beginnende Degeneration. In alten Kulturen häufig angeschwollene blasenartige Zellen, die blaß sein können oder den Zellinhalt in einem „Halbmond“ angeordnet tragen. Teilung durch Querwandbildung — symmetrisch oder asymmetrisch. Daneben auch Einschnürung zu schlanken Hantelformen, ebenfalls symmetrisch oder asymmetrisch. Hierdurch entstehen spindelige Zellpole und Flaschenzellen, welche an *Caulobacter* erinnern. In einer Kultur jeweils ein Teilungstyp vorherrschend. Zellen beweglich durch 1—4 Geißeln von $3-5,5 \mu$ Länge, die polar oder lateral angeordnet sein können. Meist ist jedoch nur 1 Geißel vorhanden. Die Wellenlänge liegt zwischen $2,4$ und $2,6 \mu$, ist aber nicht ganz konstant. Es wurden auch Werte von 3μ und einmal von $1,2 \mu$ festgestellt. Beweglichkeit im Lebendpräparat häufig durch Schleimbildung verdeckt. Keine Endosporenbildung. Neben Einzelzellen — Paare und kurze Ketten. Die häufigste Anordnung sind Sternaggregate. (Abb. 1, 2)

Jeder Zelltyp kann auch in Rosetten auftreten: kleine kokkoide Stäbchen, zylindrische Stäbchen (Abb. 1), Fadenzellen (Abb. 3), Hantelformen, mycelartige Verzweigungen und Ketten. Sternverbände bestehen aus wenigen bis zu einigen hundert Zellen. In kleinen Sternen ist das Zentrum optisch leer, oder die Zellen stoßen aneinander. In großen Rosetten erreichen die äußeren Zellen nicht das Zentrum, sie schieben sich radiär zwischen die weiter innen liegenden Zellen. Die Anordnungen können rund sein (kleine Sterne aus einzelnen Gliedern, kompakte Kugeln) oder langgestreckt erscheinen

(Raupenformen = Flaschenbürstenformen (Abb. 2)). Fadenzellen oder Ketten, die aus einem Stern herausragen, sind mit dem anderen Ende oft ebenfalls an einer Rosette beteiligt. Auf diese Weise entstehen Vernetzungen zu großflächigen Sternaggregaten. Zellen kleinerer Verbände sind häufig durch eine biegsame Substanz polar verbunden zu Zellpaaren und kurzen Ketten mit beweglichen Gliedern, aber auch zu T-Stücken. Die Substanz ist oft scharf konturiert, bis zu $0,3 \mu$ dick und dann im Phasenkontrast deutlich erkennbar. Offenbar stellt sie eine Ausscheidung der Zellpole dar. Es könnte sich dabei um dieselbe Erscheinung handeln, die von STAPP und BORTELS (1931) bei *Agrobacterium tumefaciens* als „Plasmabrücken“ beschrieben wurde. Wie bei *Agr. tumefaciens* geht auch bei den vorliegenden Organismen mit der Sternbildung eine starke Schleimabscheidung einher. In Lebendpräparaten wurden häufiger „Schleimfäden“ von beträchtlicher Länge beobachtet (Abb. 4), an denen die Zellen mit den Polen aufgehängt waren. Beginnt die Abscheidung sofort nach der Teilung, so bleiben die Zellen durch einen Schleimstrang verbunden. (Die beiden Abbildungen von sternbildenden Knöllchenbakterien Fig. 2 und Fig. 3 in NOWAK (1956), lassen sich ebenfalls so deuten, daß die Bakterien mit ihren Polen an einem Faden aufgehängt sind). Später wird der Schleimfaden länger, und andere Zellen setzen sich mit ihren schleimigen Polen daran fest. Eine ähnliche Anordnung wurde von HEUMANN (1956) für ein Rhizobium beschrieben und abgebildet.

Die Kolonien auf ZoBell-Agar sind klein, rund, glatt, glänzend, ganzrandig; zunächst farblos bis hellgrau durchscheinend. Nach einigen Tagen färbt sich das Zentrum braun. Alte Kolonien sind sehr fest.

In flüssigem ZoBell-Medium kommt es zu gleichmäßiger Trübung, bräunlichem schleimigen Sediment und Wachstum am Glas.

Legende zu den nebenstehenden Abbildungen (Tafel 1)

- Abb. 1: *Agrobacterium stellulatum* A 5.
Stadium der Sternbildung. Die meisten Einzelzellen haben sich bereits zu Rosetten vereinigt. Bemerkenswert ist die Vernetzung der Einzelsterne.
Lebendpräparat in ZoBell Agar. Phasenkontrast 2000 \times .
- Abb. 2: *Agrobacterium stellulatum* A 5.
Fortgeschrittene Sternbildung. Neben kompakten Rosetten kommen langgestreckte „Raupenformen“ vor. Durch Teilung sind winklige Zellenanordnungen entstanden.
3 Tage flüssiges ZoBell Medium. Färbung nach Bailey. Hellfeld 2000 \times .
- Abb. 3: *Agrobacterium stellulatum* A 5.
Langzellige Rosetten.
Verdünntes ZoBell Medium ($\frac{2}{5}$ konzentriert), 3 Tage. Phasenkontrast 2000 \times .
- Abb. 4: *Agrobacterium stellulatum* A 5.
Zellen und Rosetten an „Schleimfäden“ aufgehängt.
ZoBell Medium doppelt konzentriert, 3 Tage. Phasenkontrast 2000 \times .
- Abb. 5: *Agrobacterium ferrugineum* A 7.
Anfangsstadium der Sterne.
Eingetauchter Objektträger, gefärbt mit Kristallviolett. Hellfeld 2800 \times .
- Abb. 6: *Agrobacterium ferrugineum* A 7.
Sterne aus einzelnen Zellen neben vielzelligen Rosetten.
Eingetauchtes Deckglas in verdünntem ZoBell Medium. Phasenkontrast 2300 \times .
- Abb. 7: *Agrobacterium ferrugineum* A 7.
Hantelzellen. Zellpol mit knospenförmigem Teilungsstadium.
5 Tage ZoBell Agar. Färbung nach Bailey. Hellfeld 3000 \times .

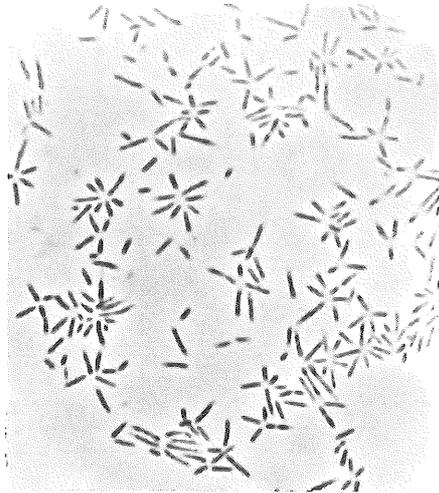


Abb. 1

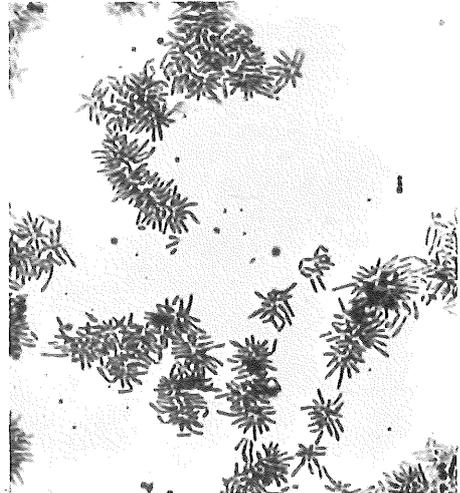


Abb. 2

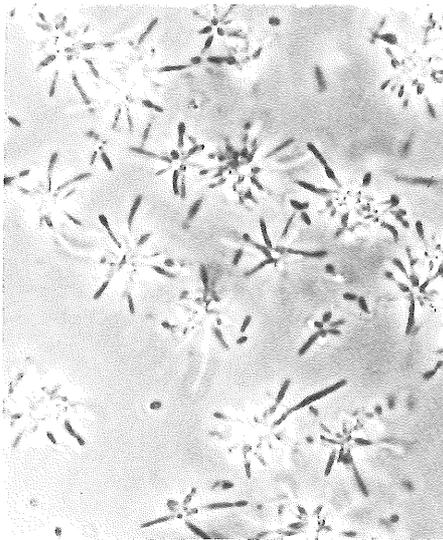


Abb. 3

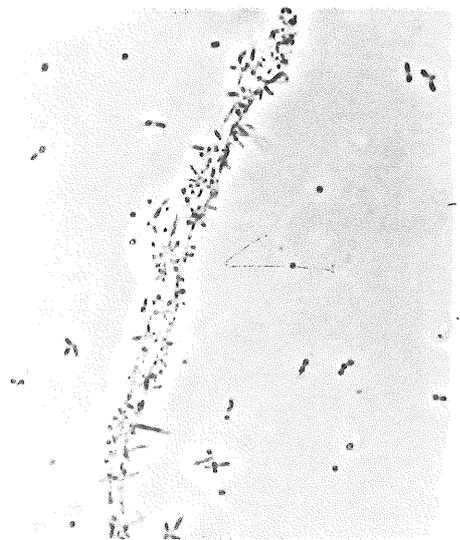


Abb. 4

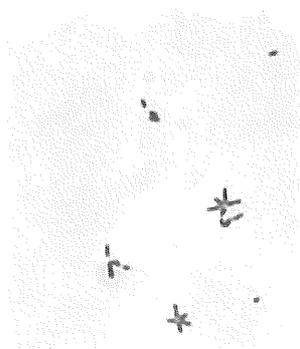


Abb. 5

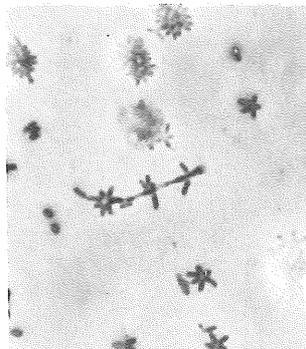


Abb. 6

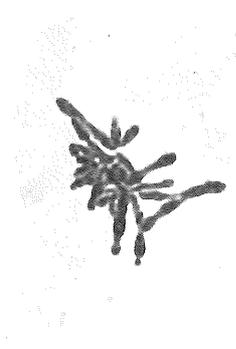


Abb. 7

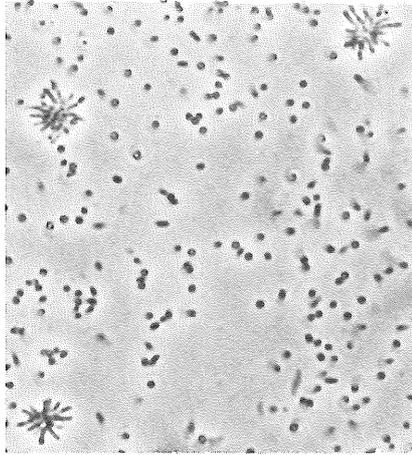


Abb. 8

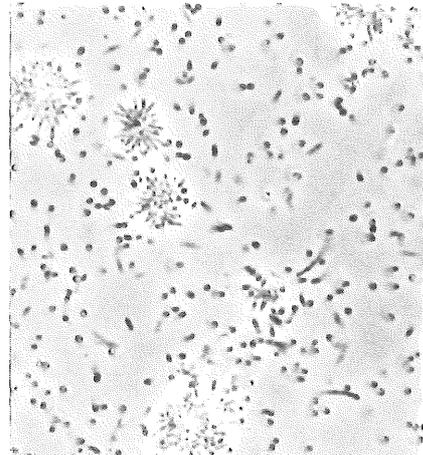


Abb. 9

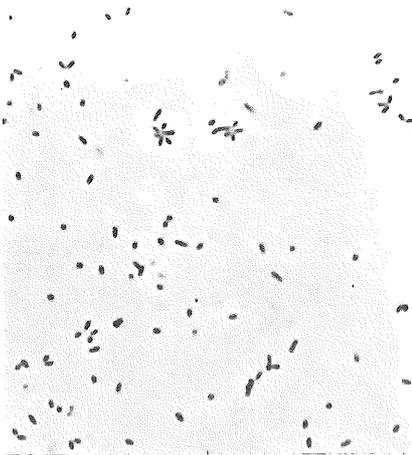


Abb. 10

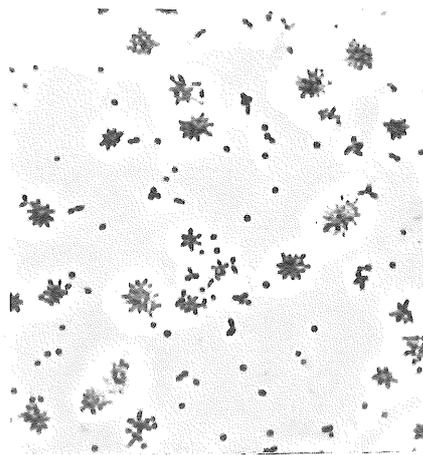


Abb. 11

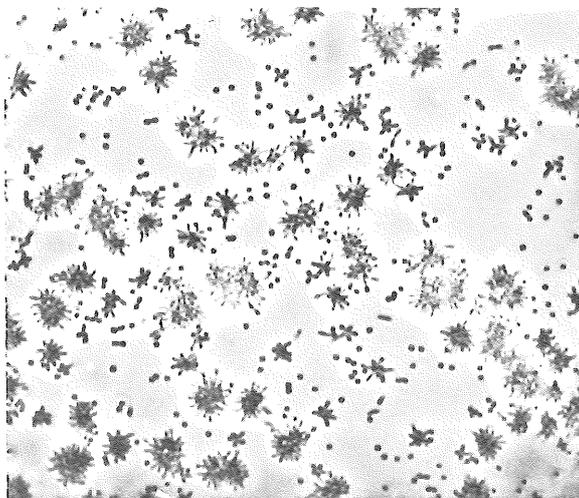


Abb. 12

Tafel 2 (zu R. Ahrens u. G. Rheinheimer)

Weitere Merkmale:

Halophil; günstiger Salzbereich 1—5% NaCl; kein Wachstum ohne NaCl.

Gramnegativ,

Katalase +,

Oxydase +,

fakultativ anaerob.

Nitrit wird aus Nitrat gebildet.

N- heterotroph (einfaches N-Medium kein Wachstum)

Gelatinestich: perlartiges Wachstum; keine Verflüssigung.

NH₃ aus Pepton: —

H₂S aus Pepton: —

Harnstoffspaltung —

Lackmusmilch: kein Wachstum

Kartoffel: kein Wachstum

Zelluloseabbau: kein Wachstum (anorg. N-Quelle)

Sulfatreduktion: kein Wachstum (anorg. N-Quelle)

Wachstum in 1% Phenol: — (anorg. N-Quelle)

Stärkeabbau: —

Säurebildung aus Kohlenhydraten: aerob weder Säure noch Gas aus Glucose, Fructose, Xylose, Maltose, Glycerin;

anaerob weder Säure noch Gas aus Glucose.

Indolbildung: —

Methylrot: —

Voges — Proskauer: —

günstiger Temperaturbereich: 15—25° C, Optimum um 22° C.

Stamm A 7:

Meist stäbchenförmige Zellen 0,35—0,8 μ \times 0,9—5 μ . Fadenzellen sind häufig; Verzweigungen wurden nur in Einzelfällen gesehen; es bestand aber niemals eine ganze Kultur aus verzweigten Fadenzellen. Hantelformen kommen vor. Blasenförmig angeschwollene Zellen konnten ebenfalls beobachtet werden. Beweglichkeit ist schwer festzustellen. Wahrscheinlich wird sie durch Schleimbildung verdeckt. In Färbungen wurden jedoch einzelne begeißelte Zellen nachgewiesen. Die Sternbildung ist sehr ausgeprägt. Sie verläuft im wesentlichen wie bei Stamm A 5 (Abb. 5—7). Runde

Legende zu den nebenstehenden Abbildungen (Tafel 2)

Abb. 8, Abb. 9

Agrobacterium luteum A 61 während der Sternbildung.

Abb. 8: Einzelne mittelgroße Rosetten neben zahlreichen Einzelzellen.

Abb. 9: Kompakte Sternverbände. Anfangsstadien aus wenigen Zellen werden bei diesem Stamm nicht beobachtet.

Eingetauchtes Deckglas in flüssigem ZoBell Medium. Phasenkontrast 2300 \times .

Abb. 10—12.

Agrobacterium sanguineum A 91.

Verschiedene Phasen der Sternbildung.

Abb. 10: Anfangsstadien aus wenigen Zellen.

Abb. 11: Mittelgroße Sterne.

Abb. 12: Die Einzelsterne haben sich zu größeren Verbänden vereinigt.

Eingetauchtes Deckglas (flüssiges ZoBell Medium). Phasenkontrast 2300 \times .

Tochterzellen an den Polen von Rosettenzellen lassen sich als Knospen deuten (Abb. 7). Die bei A 5 beschriebenen „Plasmabrücken“ und Schleimfäden wurden auch hier beobachtet.

Die Kolonien auf ZoBell-Agar sind klein, rund, glatt, glänzend, ganzrandig; zunächst farblos bis hellgrau durchscheinend; nach einigen Tagen bildet sich ein braunes Zentrum. Die Kolonien sind im Alter sehr fest. Die Braunfärbung ist intensiver als bei A 5.

In flüssigem ZoBell-Medium kommt es zu gleichmäßiger Trübung, bräunlichem schleimigem Sediment und Wachstum am Glas.

Weitere Merkmale:

halophil; günstigster Salzbereich 1—5% NaCl; Wachstum ohne NaCl möglich.

Gramnegativ

Katalase +

Oxydase +

fakultativ anaerob

Nitrat wird nicht zu Nitrit reduziert.

N-heterotroph (einfaches N-Medium) kein Wachstum

Gelatinstich: perlartiges Wachstum; keine Verflüssigung.

NH₃ aus Pepton: —

H₂S aus Pepton: —

Harnstoffspaltung: —

Lackmusmilch: kein Wachstum

Kartoffel: kein Wachstum

Zelluloseabbau: kein Wachstum (anorg. N-Quelle)

Sulfatreduktion: kein Wachstum (anorg. N-Quelle)

Wachstum in 1% Phenol: — (anorg. N-Quelle)

Stärkeabbau: —

Säurebildung aus Kohlenhydraten: aerob Säure, aber kein Gas aus Glucose, Fructose, Xylose, Maltose, Glycerin.

anaerob: keine eindeutige Reaktion (Säurebildung bereits aus dem Grundmedium ohne Kohlenhydrat).

Indolbildung: —

Methylrot: —

Voges-Proskauer: —

günstiger Temperaturbereich: 15—25° C, Optimum um 22° C.

Stamm A 61:

Verhältnismäßig dünne Stäbchen von 0,35—0,6 μ \times 0,6—3,5 μ . Häufig treten Fadenzellen von beträchtlicher Länge auf. Es besteht eine Beziehung zwischen Zelllänge und Temperatur. Bei niedrigen Temperaturen sind die Zellen klein. Extrem lange Fadenzellen, häufig über 130 μ , traten bei 30° C, kurz unter dem Temperaturmaximum, auf. Gelegentlich Verzweigungen. Vermehrung durch Querteilung. Junge Kulturen lebhaft beweglich. Die Zellen besitzen in der Regel eine (gelegentlich bis zu 4) polar inserierte Geißeln mit einer Länge von 3—6 μ und einer Wellenlänge von 2,0—2,2 μ . Keine Endosporenbildung. Gelbes unlösliches Pigment. Zellen einzeln oder in kompakten Rosetten oder Raupenformen, die erhebliche Ausmaße erreichen und in flüssigen Kulturen als 1 mm große gelbe Kugeln zu Boden sinken können. Die Zellanordnung, die bei Stamm A 5 als Aufreihung an einem Schleimfaden beschrieben wurde, ließ sich hier ebenfalls beobachten. Die Sternbildung setzt offenbar sehr plötzlich ein; über Nacht traten in einer Kultur praktisch alle Zellen zu Sternen zusammen. Die

Sternaggregate zeigen ähnliche Anordnungen wie bei A 5; jedoch besteht eine Tendenz zur Ausbildung besonders großer und kompakter Rosetten (Abb. 8, 9).

Die Kolonien auf ZoBell-Agar sind zitronengelb, klein, rund, konvex, ganzrandig, leicht glänzend. Oberfläche fein genarbt; anfangs leicht durchscheinend, später trüb mit schmalen terrassenförmigem Rand. Wachstum langsam.

In flüssigem ZoBell-Medium kommt es zu gleichmäßiger Trübung. Starkes Wachstum am Glas, besonders oben; Ring aus runden gelben Kolonien, zarte Haut. Wachstum langsam.

Weitere Merkmale:

Halophil. Kein Wachstum ohne NaCl.

Gramnegativ

Katalase +

Oxydase +

fakultativ anaerob.

Nitrat wird nicht zu Nitrit reduziert.

N-heterotroph (einfaches N-Medium kein Wachstum)

Gelatinestich: Wachstum fein perlartig, keine Verflüssigung.

NH₃ aus Pepton: —

H₂S aus Pepton: —

Zelluloseabbau: —

Stärkeabbau: —

Säurebildung aus Kohlenhydraten: aerob weder Säure noch Gas aus Glucose, Fructose, Galactose, Xylose, Maltose, Glycerin.

anaerob: keine eindeutige Reaktion

Indolbildung: —

Methylrot: —

Voges-Proskauer: —

günstigster Temperaturbereich: 20—30° C; Optimum um 30° C.

Stamm A 91

Stäbchenförmige Zellen von 0,4—0,7 μ \times 0,8—4 μ , meist 0,6 μ \times 1—1,3 μ . Zelllänge temperaturabhängig. Vermehrung durch Querteilung. Junge Kulturen lebhaft beweglich. Im Lebendpräparat heften sich die Zellen häufig mit einem Pol fest und führen heftige Schwingungen aus. Sie können sich losreißen und an anderer Stelle erneut festsetzen. Geißelfärbungen ergaben 1—2 Geißeln von 4—7 μ Länge; polare Anordnung herrschte vor. Die Wellenlänge betrug meist 2,2 μ . Keine Endsporenbildung. Rotes unlösliches Pigment. Die intensive Rosettenbildung liefert Anordnungen, die denen von A 61 ähnlich sehen (Abb. 10—12). Der bei A 5 beschriebene Schleimfaden, an dem die Zellen mit den Polen aufgehängt sind, wurde bei A 91 ebenfalls beobachtet. Der Faden hatte in regelmäßigen Abständen dunkle Knötchen.

Kolonien auf ZoBell-Agar anfangs ziegelrot, später dunkelblutrot; klein, rund, glatt, glänzend, konvex, ganzrandig.

In flüssigem ZoBell-Medium gleichmäßige rote Trübung, rotes schleimiges Sediment.

Weitere Merkmale:

Halophil; Wachstum ohne NaCl spärlich.

Gramnegativ

Katalase +

Oxydase +

Nitrit wird kaum aus Nitrat gebildet.

N-heterotroph (einfaches N-Medium; kein Wachstum)

NH_3 aus Pepton: sehr wenig
 H_2S aus Pepton: —
 Zelluloseabbau (organisches Grundmedium): —
 Stärkeabbau: —
 Säurebildung aus Kohlenhydraten: aerob weder Säure noch Gas aus Glucose, Fructose, Xylose, Maltose, Glycerin.
 anaerob: weder Säure noch Gas aus Glucose.
 Indolbildung: —
 Methylrot: —
 Voges-Proskauer: —
 günstigster Temperaturbereich: 20—37° C, Optimum 30° C.

Diskussion

Die 4 untersuchten Stämme lassen sich nach BERGEY'S MANUAL, 7. Aufl., alle der Familie der Rhizobiaceae zuordnen. Innerhalb der Familie stehen sie der Gattung *Agrobacterium* am nächsten. Abweichend ist allerdings die Bildung von gelbem bzw. rotem Pigment bei den Stämmen A 61 und A 91. Die beiden anderen Gattungen kommen jedoch nicht in Frage. Bei *Rhizobium* haben wir es mit symbiontischen „Knöllchenbakterien“ zu tun, und *Chromobacterium* ist durch ein violettes Pigment charakterisiert. Es wäre allerdings zu erwägen, die nicht phytopathogenen Arten von *Agrobacterium* zu trennen und zu einer eigenen Gattung zusammenzufassen.

Die Übereinstimmung der neuen Stämme mit dem marinen *Agrobacterium stellulatum* STAPP und KNÖSEL ist sehr weitgehend. Die wenigen Unterschiede sind in der Tabelle 1 gegenübergestellt.

Besonders groß ist die Ähnlichkeit zwischen *A. stellulatum* und unserem Stamm A 5. Die Begeißelung ist bei den einzelnen *Agrobacterium*-Arten variabel; meist werden 1—4 peritriche Geißeln gefunden, so daß hier kein grundsätzlicher Unterschied besteht. Der bei A 5 beobachtete starke Pleomorphismus wurde bei *Agr. stellulatum* offenbar nicht gefunden. Doch könnte man z. B. eine bei STAPP und KNÖSEL (1954) als Zellverschmelzung gedeutete Elektronenaufnahme (El 3) auch für eine Verzweigung halten, wie sie bei unseren Ostseestämmen nicht selten vorkommen. Bei *Agrobacterium tumefaciens* kommen gelegentlich Y- und anders verzweigte Formen vor (STAPP, 1958, p. 70).

Die Braunfärbung der Kolonien wurde bei *Agr. stellulatum* nicht beobachtet. Dieses scheint der einzige bedeutendere Unterschied gegenüber A 5 zu sein.

Offenbar handelt es sich um ein extrazelluläres nicht wasserlösliches Pigment. In Lebendpräparaten aus braunen Kolonien befinden sich amorphe Stücke einer goldgelben stark lichtbrechenden Substanz, welche meist außen an vergrößerten Zellen haften. Der Farbstoff erinnert an Melanine, da er in ganz jungen Kulturen noch nicht auftritt. Das Enzym Polyphenoloxydase, das an der Melaninbildung beteiligt ist, läßt sich durch Schwarzfärbung von Tyrosinagarplatten nachweisen (THIMANN, 1964, S. 332f.). Die Stämme A 5 und A 7 färbten ZoBell-Agar mit 1% L-Tyrosin in 14 Tagen schwach dunkelbraun. Junge Kolonien von A 5 und A 7 sind noch ungefärbt.

Infolge der weitgehenden Übereinstimmung möchten wir den Stamm A 5 zu *Agrobacterium stellulatum* STAPP und KNÖSEL 1954, stellen. Der Stamm A 7 besitzt nicht die Fähigkeit, Nitrat zu Nitrit zu reduzieren, und vermag in Medien ohne NaCl zu wachsen, wenn auch wesentlich langsamer als in entsprechenden Seewassermedien. Er unterscheidet sich weiterhin durch die Säurebildung aus einigen Kohlenhydraten von A 5. Auch die Braunfärbung der Kolonien ist bei A 7 stets intensiver. Es scheint daher ge-

Tabelle 1

Gegenüberstellung der wichtigsten Merkmale der vier aus der Ostsee isolierten *Agrobacterium*-Stämme und von *Agrobacterium stellulatum* STAPP und KNÖSEL (nach der Literatur), bei denen Unterschiede vorhanden sind

	A 5	A 7	A 61	A 91	<i>Agr. stellulatum</i>
Zellen	Stäbchen 0,4—1 μ \times 0,6—2,5 μ , meist 0,6 \times 1,7 μ ; häufig Fadenzellen	Stäbchen 0,35—0,8 μ \times 0,9—5 μ , meist 0,4 \times 1,7 μ ; häufig Fadenzellen	Stäbchen 0,35—0,6 μ \times 0,6—3,5 μ , meist 0,4 \times 2 μ ; häufig Fadenzellen	Stäbchen 0,4—0,7 μ \times 0,8—4 μ , meist 0,6 \times 1—1,3 μ	Stäbchen 0,2—0,8 μ \times 0,3—2,1 μ
Begeißelung	1—4(8) Geißeln polar oder lateral $\lambda = 2—3 \mu$; meist 2,4—2,6 μ l = 3—5,5 μ	Geißeln selten $\lambda = 2 \mu$ l = 4,5 μ	1(—4) Geißeln meist polar $\lambda = 2,0—2,2 \mu$ l = 3—6 μ	1—2 Geißeln, meist polar $\lambda = 2,0—2,4 \mu$ l = 4—7 μ	1 polare Geißel
135 Agarkolonien auf 2216 E	klein, rund, glatt, hellgrau durch- scheinend; später braunes Zentrum; glänzend	klein, rund, glatt, hellgrau durch- scheinend; später braunes Zentrum; glänzend	klein, rund, fein genarbt, durch- scheinend; später trüb; matt	klein, rund, glatt, glänzend	klein, rund, glatt, glänzend
Färbung der Kolonien	braun	braun	zitronengelb	rot	hellgrau
Wachstum ohne NaCl	—	+	—	schwach	schwach
Nitrit aus Nitrat	+	—	—	sehr wenig	+
günstigster Temperaturbereich . .	15—25°	15—25°	20—30°	20—37°	15—25°
oxydative Säurebildung aus:					
Glucose	—	+	—	—	—
Fructose	—	+	—	—	—
Xylose	—	+	—	—	—
Maltose	—	+	—	—	—
Glycerin	—	+	—	—	—

rechtfertigt, den Stamm A 7 als eigene Art abzugrenzen, für die wir den Namen *Agrobacterium ferrugineum* nov. spec. vorschlagen.

Die Stämme A 61 und A 91 unterscheiden sich von *Agr. stellulatum* vor allem durch die Bildung eines gelben bzw. roten Pigmentes. Auch morphologisch sind sie etwas verschieden. Jedoch verlaufen die biochemischen Tests sehr ähnlich. Die Abgrenzung als eigene Arten scheint uns gerechtfertigt. Wir schlagen für den Stamm A 61 den Namen *Agrobacterium luteum* nov. spec. und für A 91 *Agrobacterium sanguineum* nov. spec. vor.

Außer den beschriebenen Stämmen ist noch eine Reihe weiterer Sternbildner aus der Ostsee isoliert worden. Eine eingehende Untersuchung ihrer Taxonomie und Ökologie erfolgt zur Zeit in der Abteilung Marine Mikrobiologie des Instituts für Meereskunde der Universität Kiel. Hierüber wird dann zu gegebener Zeit berichtet werden.

Literaturverzeichnis

- ANDERSON, J. I. W. (1962): Studies on micrococci isolated from the North Sea. *J. appl. Bact.* **25**, 362—368. — BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology (1957): 7. Auflage, Baltimore. — BEYERINCK, M. W. (1890): Künstliche Infektion von *Vicia faba* mit *Bacillus radicumicola*. *Bot. Ztg.* **48**, 837—843. — BRISOU, J. & VARGUES, H. (1963): Proteolysis and nitrate reduction in sea water. In: *Marine Microbiology, a symposium*, Oppenheimer, C. H., Hrsg., Springfield, Illinois, U.S.A., 410—414. — CLARKE, P. H. (1953): Hydrogen sulphide production by bacteria. *J. gen. Microbiol.* **8**, 397—407. — CONTI, S. F. & HIRSCH, P. (1965): Biology of budding bacteria, III. Fine structure of *Rhodocyclidium* and *Hyphomicrobium*. *J. Bact.* **89**, 503—512. — GRÄF, W. & STÜRZENHOFECKER, P. (1964): Biologie und Vorkommen von aeroben Wassermixobakterien (*Sporocytophaga cauliformis*) im Bodensee. *Arch. Hyg.* **148**, 79—96. — HAROLD, RUTH & STANIER, R. Y. (1955): The genera *Leucothrix* and *Thiothrix*. *Bactl. Rev.* **19**, 49—64. — HAYES, P. R. (1963): Studies on marine flavobacteria. *J. gen. Microbiol.* **30**, 1—19. — HEUMANN, W. (1956): Der Sexualcyclus sternbildender Bakterien. *Arch. Mikrobiol.* **24**, 362—395. — HOUWINK, A. L. (1955): Caulobacter. Its morphogenesis, taxonomy, and parasitism. *Antonie van Leeuwenhoek J. Mikrobiol. Serol.* **21**, 49—64. — KNÖSEL, D. (1962): Prüfung von Bakterien auf Fähigkeit zur Sternbildung. *Zblt. Bakt., Abt. II*, **116**, 79—100. — LEIFSON, E. (1963): Determination of carbohydrate metabolism of marine bacteria. *J. Bact.* **85**, 1183—1184. — *Manual of Microbiological Methods* (1957): Edited by the Society of American Bacteriologists, McGraw-Hill, New York, Toronto, London. — MARX, RUTH & HEUMANN, W. (1962): Über Geißelfeinstrukturen und Fimbrien bei zwei *Pseudomonas*-Stämmen. *Arch. Mikrobiol.* **43**, 245—254. — NOWAK, W. (1956): Beobachtungen zur Sternbildung bei Knöllchenbakterien verschiedener Herkunft (*Bact. radicumicola* BEIJ. bzw. *Rhizobium* sp.). *Naturwissenschaften* **43**, 22—23. — OPPENHEIMER, C. H. (1964): *Culture Media for Marine Microbiology*. Institute of Marine Science, Univ. of Miami, Florida 33149. — *Oxoid Manual of Culture Media, including Ingredients and Other Laboratory Services* (1962): 2. Auflage, London. — PFISTER, R. M. & BURKHOLDER, P. R. (1965): Numerical taxonomy of some bacteria isolated from Antarctic and Tropical seawaters. *J. Bact.* **90**, 863—872. — PRINGSHEIM, E. G. (1957): Observations on *Leucothrix mucor* and *Leucothrix cohaerens* nov. sp. With a survey of colourless filamentous organisms. *Bactl. Revs.* **21**, 69—76. — RHEINHEIMER, G. (1966): Einige Beobachtungen über den Einfluß von Ostseewasser auf limnische Bakterienpopulationen. *Veröff. Inst. Meeresf. Bremerhaven, Sonderbd. II*, 237—244. — RIKER, A. J., SPOERL, E. & GUTSCHE, A. E. (1946): Some comparisons of bacterial plant galls and of their causal agents. *Botan. Rev.* **12**, 57—82. — SIEBERT, G. & SCHWARTZ, W. (1956): Untersuchungen über das Vorkommen von Mikroorganismen in entstehenden Sedimenten. *Arch. Hydrobiol.* **52**, 321—366. — SKERMAN, V. B. D. (1959): *A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria, with Methods and Digests of Generic Characteristics*. Baltimore: Williams and Wilkins Co. — STAPP, C. (1958): *Pflanzenpathogene Bakterien*, p. 69—101. Berlin, Hamburg: Parey. — STAPP, C. & BORTELS, H. (1931): Der Pflanzenkrebs und sein Erreger *Pseudomonas tumefaciens*. II. Mitteilung: Über den Lebenskreislauf von *Ps. tumefaciens*. *Zschr. für Parasitenkunde* **4**, 101—125. — STAPP, C. & KNÖSEL, D. (1954): Zur Genetik sternbildender Bakterien. *Zblt. f. Bakt., Abt. II*, **108**, 243—259. — STOVE POINDEXTER, Jeanne (1964): Biological properties and classification of the Caulobacter group. *Bactl. Rev.* **28**, 231—295. — STOVE, J. L. (1965): Isolation of Caulobacter spp. from water. In: *Anreicherung und Mutantenauslese*. *Zblt. f. Bakt., Parasitenk., Infektionskrankh. u. Hygiene, Abt. I, Supplementheft 1*, Hrsg. Schlegel, H. G., pp. 95—99. — THIMANN, K. V. (1964): *Das Leben der Bakterien* (p. 332/333). VEB Gustav Fischer, Jena. — WATANABE, N. (1960): On the life cycle of *Spirillum japonicum*. *Bot. Mag. Tokyo* **73**, 44. — ZOBELL, C. E. & UPHAM, H. C. (1944): A list of marine bacteria including descriptions of sixty new species. *Bull. Scripps Inst. Oceanogr.* **5**, 239—292.