

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.

Aus dem Hygiene-Institut und dem Institut für Meereskunde der Universität Kiel

Elektronenoptische Untersuchungen über sternbildende Bakterien aus der Ostsee

VON GEORG MOLL, RENATE AHRENS UND GERHARD RHEINHEIMER

Zusammenfassung: Die Sternbildung von drei *Agrobacterium*-Arten aus der Ostsee wurde anhand von bedampften und unbedampften Präparaten und von Ultradünnschnitten elektronenoptisch untersucht.

Bei allen drei Arten wurde eine Haftsubstanz nachgewiesen, an der sich die Zellen mit ihren Polen festheften. Sie wird von den Zellpolen abgeschieden.

Die Sternzellen waren stets von einer deutlichen Zellwand begrenzt. Anhaltspunkte für eine Zell- oder Kernverschmelzung im Sternzentrum konnten nicht gefunden werden. Es bestand keine eindeutige Tendenz zur Verlagerung der DNS in den zentralen Pol.

Agrobacterium luteum besitzt polare Fimbrien, die offenbar für die Entstehung der Sterne wichtig sind.

Im Zentrum der Rosetten befinden sich runde Granula von einheitlichem Aufbau. Sie werden in bedampften Präparaten ganzer Zellen und in Ultradünnschnitten abgebildet. Ihre Bedeutung wird diskutiert.

Electron microscopic investigations on star forming bacteria from the Baltic Sea. (Summary): The star formation of three species of *Agrobacterium* from the Baltic Sea was examined by electron microscopy of shadowed and unshadowed preparations.

In all three species a holdfast material was found to exist, to which the cells are attached by means of their poles. This holdfast material is a secretion of the cell poles.

The individual cells of the stars were in all cases limited by a distinct cell wall. There was no indication of a fusion of the cells or the nuclei in the centre of the stars. Nor was any definite tendency found for the DNA to gather at the central pole.

Agrobacterium luteum has polar fimbriae, which appear to be important for the formation of the stars.

In the centre of the rosettes round granules of equal structure are to be found. They are demonstrated in shadowed preparations of whole cells and in ultrathin sections. Their importance is discussed.

Die vorliegenden Untersuchungen erfolgten an einigen sternbildenden Bakterien aus der Ostsee, die in einer früheren Veröffentlichung (AHRENS und RHEINHEIMER, 1967) beschrieben wurden. Es handelt sich um Angehörige der Gattung *Agrobacterium* (*Rhizobiaceae*). Vertreter dieser Gattung sind häufig für die Untersuchung des Phänomens der Sternbildung herangezogen worden. STAPP und Mitarbeiter haben für *Agrobacterium tumefaciens* einen Zyklus der Sternvorgänge zusammengestellt, der als Sexualzyklus gedeutet wird und folgenden Ablauf hat:

Gut bewegliche Schwärmzellen lagern sich in geeigneten Medien zu Sternen zusammen, indem sie sich nacheinander mit den Polen an einer Glasfläche oder an der dünnen Oberflächenhaut festheften. Die Kerne der Sternzellen liegen im zentralen Pol. Die Kernsubstanz verschmilzt zu einem abgerundeten Kern. Der Verschmelzungskern hat bei den sogenannten Raupenformen eine langgestreckte Gestalt. Nach der Verschmelzung wird die Kernsubstanz wieder aufgeteilt; die Zellen lösen sich voneinander. Die ehemaligen Sternzellen machen eine Kernvermehrung durch, wobei sie gleichzeitig in die Länge und Dicke wachsen. Schließlich zerfallen die Langzellen in Kurzstäbchen, wie sie zu Beginn des Zyklus vorlagen (s. STAPP, 1942; STAPP und KNÖSEL, 1954).

Der Sternzyklus von *Agrobacterium radiobacter* und *Agrobacterium stellulatum* stimmt im wesentlichen mit dem für *Agrobacterium tumefaciens* beschriebenen überein (STAPP und KNÖSEL, 1954).

Es lag nahe zu prüfen, ob die Sternbildner aus der Ostsee einen entsprechenden Sexualzyklus aufweisen. Wegen der Kleinheit des Objektes können Kernvorgänge und Zellverschmelzungen im Lichtmikroskop nicht eindeutig festgestellt werden. Auch elektronenoptische Untersuchungen ganzer Zellen vermögen keinen hinreichenden Aufschluß über etwaige Austauschvorgänge der Kernsubstanz zu geben. Daher sollte versucht werden, die Vorgänge im Sternzentrum mit Hilfe von Ultradünnschnitten zu untersuchen.

Methoden

Anzucht der Bakterien

Es wurden folgende 3 Bakterienstämme untersucht:

Agrobacterium stellulatum, Stamm A 5, *Agrobacterium ferrugineum*, Stamm A 7, und *Agrobacterium luteum*, Stamm A 61. Alle stammen aus Ostseewasser (AHRENS und RHEINHEIMER, 1967).

Die Anzucht der Bakterien erfolgte auf ZoBell-Agar 2216 E oder auf dem gleichen Medium ohne Agarzusatz. Das flüssige Medium fand auch in verdünnter Form Verwendung. Es wurde dann ein Gemisch aus 3 Teilen gealtertem Seewasser und einem Teil dest. Wasser („Seewassergemisch“) zugesetzt. Die Anzucht auf festem ZoBell-Medium gelang am besten in Babyflaschen, die mit 40 ml Agar schräg gelegt wurden. Als Impfmateriale diente ein Röhrchen einer jungen flüssigen Kultur. Nach etwa 3 tägiger Bebrütung bei Zimmertemperatur war ein Wachstumsfilm sichtbar. Die Zellen wurden mit Seewassergemisch abgespült, abzentrifugiert, einmal mit Seewassergemisch gewaschen und erneut in Seewassergemisch resuspendiert. Die weitere Behandlung wird unten beschrieben.

Für die flüssige Anzucht erwiesen sich 300 ml-Erlenmeyerkolben als zweckmäßig. Sie enthielten je 150 ml Nährlösung. Bebrütung erfolgte bei Zimmertemperatur. Die Kulturen wurden täglich im Lichtmikroskop durchgemustert. Sobald die Sternbildung einsetzte, wurden sie weiter verarbeitet (3—5 Tage). Mit Hilfe eines Magnetrührers konnten bereits in einem Tag geeignete Kulturen erhalten werden.

Elektronenoptische Präparation

Vorfixation:

Zu je 10 ml Zellsuspension bzw. flüssiger Kultur wurde 1 ml der folgenden Fixationslösung gegeben:

Legende zu den nebenstehenden Abbildungen (Tafel 1)

- Abb. 1: *Agrobacterium stellulatum* A 5.
Flüssiges ZoBell-Medium, 2 Tage. Zellen fixiert und mit Pt/C schräg bedampft.
Geißeln an einer Rosettengruppe. 8000 ×.
- Abb. 2: *Agrobacterium stellulatum* A 5.
ZoBell Schrägagar, 2 Tage.
Mehrfach verzweigte Zelle im Ultradünnschnitt. Die hellen Zonen stellen DNS dar. 11350 ×.
- Abb. 3: *Agrobacterium stellulatum* A 5.
Flüssiges ZoBell-Medium, 6 Tage. 15° C. Zellen fixiert und mit Pt/C schräg bedampft.
Blasenzelle, wahrscheinlich einer Rosette angehörend. 6650 ×.
- Abb. 6: *Agrobacterium stellulatum* A 5.
ZoBell-Schrägagar, 2 Tage. Ultradünnschnitt.
Ausscheidung der Haftsubstanz an den Zellpolen. 22000 ×.



Abb. 1



Abb. 2

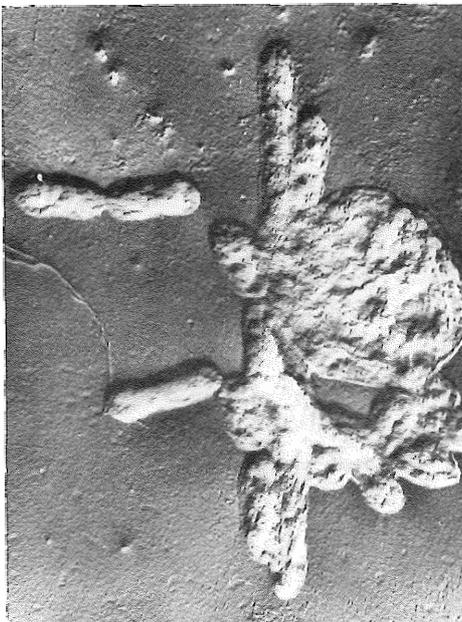


Abb. 3



Abb. 6

Tafel 1 (zu G. Moll, R. Ahrens u. G. Rheinheimer)



Abb. 4

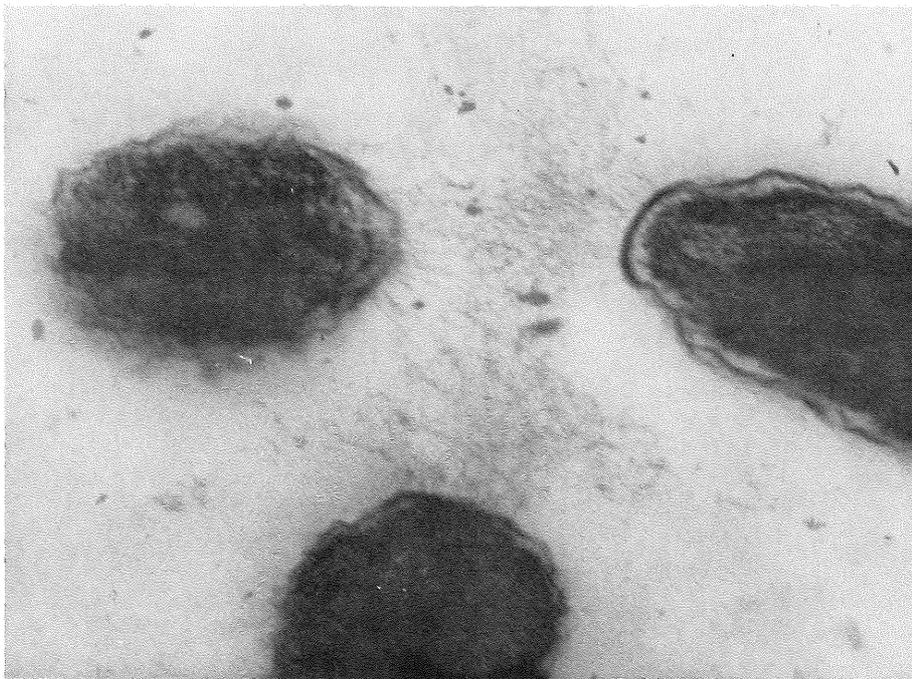


Abb. 5

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

Fixationslösung nach GIESBRECHT (1962), abgewandelt:

1,5% OsO₄ und 1,65% K₂Cr₂O₇ in Seewassergemisch (s. o.) lösen. pH 7,2 mit 2,5 n KOH einstellen. Vor Gebrauch 2,5% Saccharose hinzufügen.

Die Dauer der Vorfixation betrug 30 Min.

Hauptfixation:

Die Zellen wurden abzentrifugiert und in Fixationslösung (s. o.) aufgenommen und 2 Stunden bei Zimmertemperatur fixiert.

Agareinbettung und Entwässerung:

Nach der Hauptfixation wurden die Zellen abzentrifugiert und mit Seewassergemisch gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden mit warmem 2,5%igem Difco-Agar verrührt. Nach dem Erkalten wurde der Agar in kleine Würfelchen von ca. 1 mm Kantenlänge geschnitten (KELLENBERGER und RYTER, 1955). Die Agarwürfelchen wurden in eine Lösung von 1% Uranylacetat und 2,5% Saccharose in Seewassergemisch gegeben und dort 2 Stunden im Dunkeln belassen. Anschließend wurde in aufsteigender Alkoholreihe entwässert, wobei die Agarwürfel nacheinander je 15 Min in 30%, 50%, 70%, 90% Alkohol und 2 mal je 15 Min. in absoluten Alkohol gebracht wurden und schließlich 2 mal je 15 Min. in Propylenoxyd.

Einbettung:

Nach dem Entwässern wurden die Agarblöcke stufenweise in Durcupan ACM-Gemisch (Fluka) mit abnehmenden Mengen von Propylenoxyd getränkt. Schließlich wurde in reinem Durcupan ACM-Gemisch mit Hilfe von Gelatinekapselfn eingebettet.

Das Einpolymerisieren dauerte bei 60° C 48 Stunden.

Schneiden, Nachkontrastierung:

Die Präparate wurden mit einem LKB-Ultratome III ultradünngeschnitten und mit Bleicitrat nachkontrastiert (REYNOLDS, 1963).

Elektronenmikroskop:

Als Mikroskop stand das „Elmiskop I“ von Siemens zur Verfügung. Die elektronenoptischen Aufnahmen wurden bei 8000facher und 20000facher Vergrößerung angefertigt.

Nach dieser Behandlung war die Kernsubstanz (DNS) in den Zellen als helle Zone mit dunkleren Fibrillenstrukturen deutlich zu erkennen.

Tupfpräparate ganzer Zellen:

Nach der Vorfixation (s. o.) wurden die Zellen abzentrifugiert und in Seewassergemisch resuspendiert. Mit einer Öse wurde das Material auf vorbereitete Netzfolien aufgetupft. Die Schrägbedampfung der Präparate erfolgte mit Pt/C.

Legende zu den nebenstehenden Abbildungen (Tafel 2)

Abb. 4: *Agrobacterium stellulatum* A 5.

ZoBell-Schrägagar, 2 Tage. Ultradünnschnitt.

Sternzellen um eine zarte Haftsubstanz angeordnet. Die DNS (helle Zonen) ist in mehreren Portionen über die Zellen verteilt. 21 000 ×.

Abb. 5: *Agrobacterium stellulatum* A 5.

ZoBell-Schrägagar, 2 Tage. Ultradünnschnitt.

Abscheidung der Haftsubstanz an den Zellpolen. 92 500 ×.

Ergebnisse

Ziel der elektronenoptischen Untersuchungen war es, festzustellen, ob bei einem der Stämme A 5, A 7 oder A 61 Kernvorgänge nachgewiesen werden können, wie sie von STAPP und KNÖSEL für *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium stellulatum* und *Agrobacterium radiobacter* beschrieben wurden. Insbesondere sollte geprüft werden, ob sich die DNS im zentralen Pol der Sternzellen sammelt, ob eine Zellverschmelzung oder ein anderer Sexualvorgang festzustellen ist.

In Ultradünnschnitten der 3 untersuchten Stämme, die den zentralen Bereich von Rosetten trafen, war die DNS wie in allen übrigen Zellen deutlich zu erkennen. Es bestand keine eindeutige Tendenz zu einer Sammlung der DNS im zentralen Pol der Sternzellen (Abb. 4, 10, 11, 17, 18).

Bedampfte Präparate ganzer Zellen erweckten gelegentlich den Eindruck von Zellverschmelzungen. In unbedampften Präparaten oder in Ultradünnschnitten waren stets die Zellgrenzen deutlich sichtbar.

Entsprechend gab es auch keine Anhalte für eine Verschmelzung der Zellkerne und eine anschließende Aufgliederung eines Verschmelzungskernes in Einzelkerne. Häufig wurde im Zentrum von Sternbildungen eine Substanz gefunden, die als Haftsubstanz gedeutet wird und verschiedene Strukturierungen aufweisen kann.

Bei Stamm A 7 wurden feine Verbindungen zwischen den Zellen gefunden. Es könnte sich dabei um Schleimstränge handeln, vielleicht aber auch um Konjugationsbrücken.

Der Stamm A 61 zeigte eine Besonderheit, die bei *Agrobacterium*-Arten bisher nicht beschrieben wurde. Im Zentrum von Rosetten befanden sich häufig Gruppen kugelliger Gebilde von sehr einheitlicher Struktur, die möglicherweise das Produkt eines Sexualaktes darstellen.

Im folgenden werden die elektronenoptischen Befunde für die einzelnen Stämme beschrieben.

Agrobacterium stellulatum, Stamm A 5

Die elliptischen bis stäbchenförmigen Zellen sind gerade oder leicht gekrümmt. Die Vermessung von elektronenoptischen Aufnahmen ergibt eine Größe von $0,4-0,7 \times 1-3,5 \mu$, meist $0,6 \times 1,8 \mu$. Die Teilung kann durch Querwandbildung oder durch Einschnürung erfolgen.

Legende zu den nebenstehenden Abbildungen (Tafel 3)

Abb. 7: *Agrobacterium ferrugineum* A 7.

ZoBell-Schrägagar, 3 Tage.
Semidünnschnitt durch eine Rosette. $9350 \times$.

Abb. 8: *Agrobacterium ferrugineum* A 7.

ZoBell-Schrägagar, 3 Tage. Zellen fixiert und mit Pt/C schräg bedampft.
Übersicht über zwei Rosettengruppen. Die zentral verjüngten Zellen sind Vorstufen der Teilung durch Einschnürung. Bei der Teilung einer Sternzelle ist eine winklige Anordnung entstanden. $2450 \times$.

Abb. 9: *Agrobacterium ferrugineum* A 7.

ZoBell-Schrägagar, 3 Tage. Zellen fixiert und mit Pt/C schräg bedampft.
Sternzentrum mit Haftsubstanz. Eine Sternzelle hat die Teilung fast abgeschlossen. Die Protoplasten sind bereits getrennt; die Zellwand ist noch nicht durchgeschnürt. $12700 \times$.

Abb. 10: *Agrobacterium ferrugineum* A 7.

ZoBell-Schrägagar, 3 Tage.
Ultradünnschnitt durch ein Sternzentrum. Die Haftsubstanz erscheint grobkörnig bis amorph. — Eine Zelle hat sich durch Einschnürung geteilt. Die Tochterzellen sind winklig angeordnet und einseitig verjüngt. — Eine Verlagerung der DNS (helle Zonen) zum Sternzentrum kann hier nicht festgestellt werden. $9100 \times$.

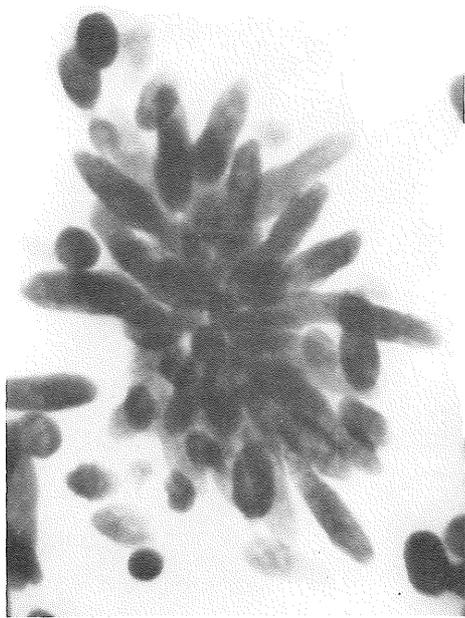


Abb. 7

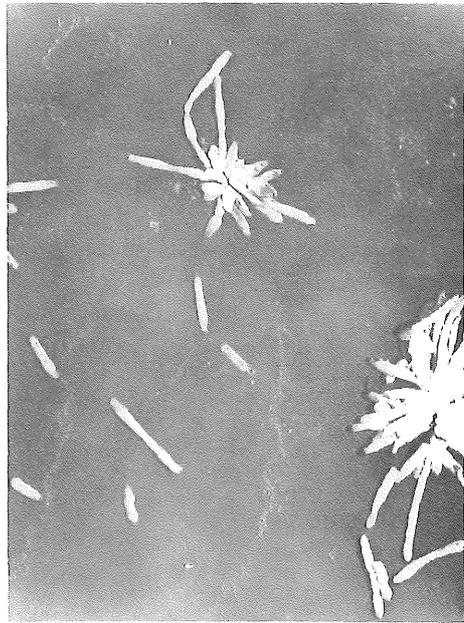


Abb. 8

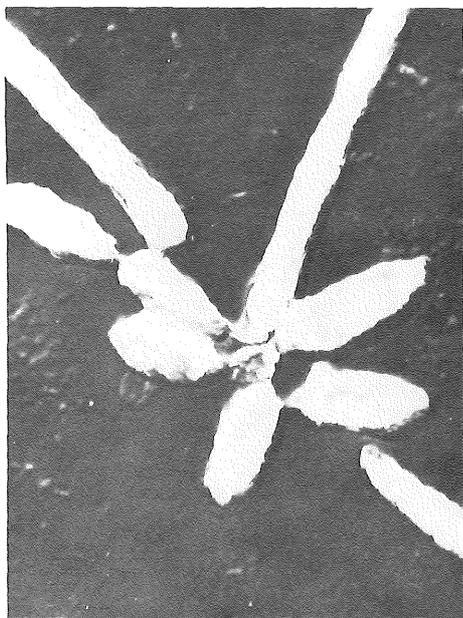


Abb. 9



Abb. 10

Tafel 3 (zu G. Moll, R. Ahrens u. G. Rheinheimer)

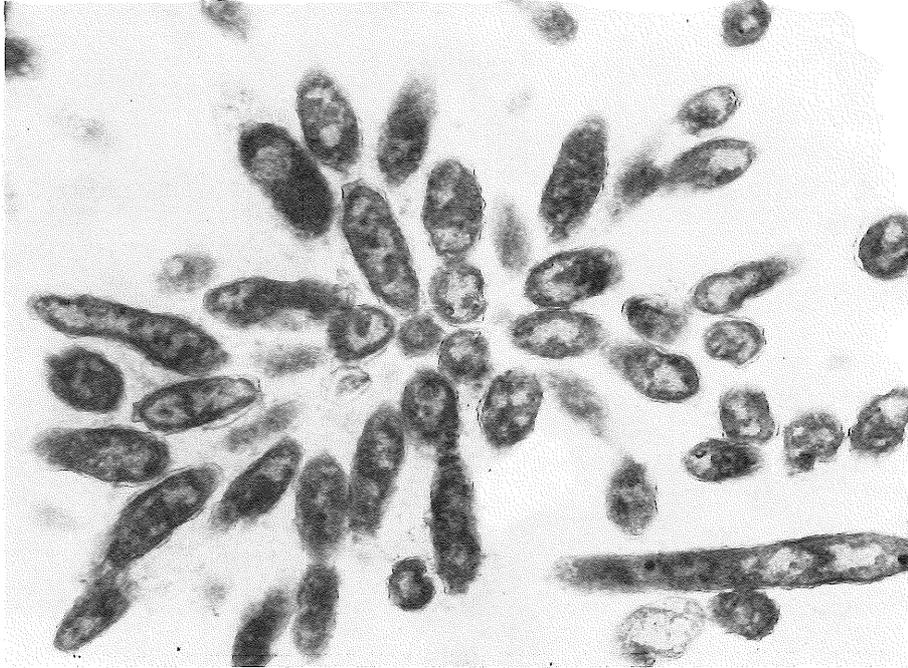


Abb. 11

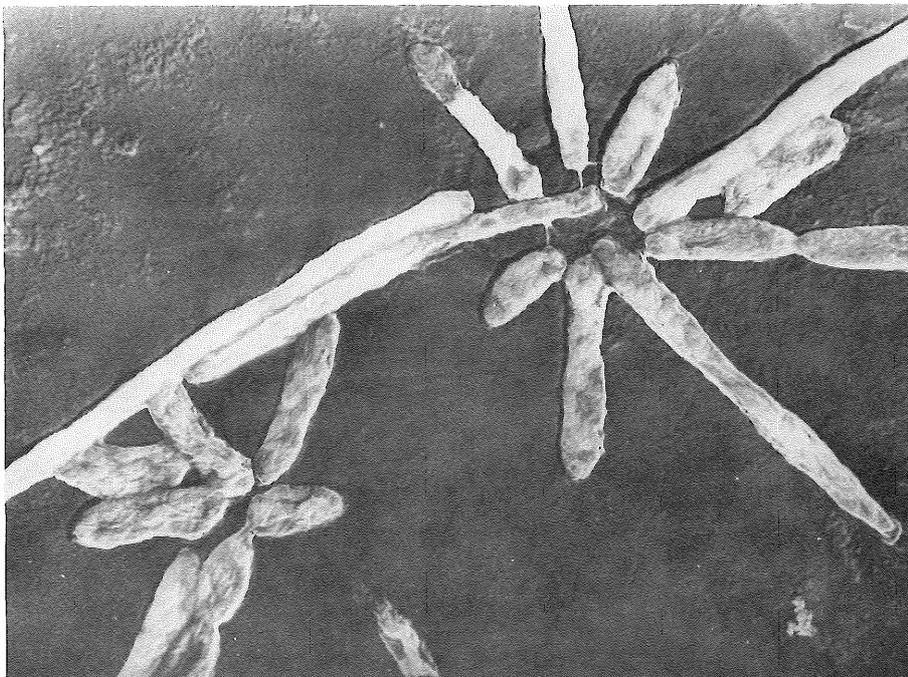


Abb. 12

Tafel 4 (zu G. Moll, R. Ahrens u. G. Rheinheimer)

Einzelzellen und Sternzellen können ein Büschel von 1—8 Geißeln tragen (Abb. 1). Einzelne Geißeln sind beliebig angeordnet; Geißelbüschel sitzen häufig am Pol. Bei Sternzellen kann auch der zentrale Pol die Geißeln tragen (Abb. 1). Die Wellenlänge betrug 2,1—3,3 μ , meist 2,8 μ .

Neben „normalen“ Stäbchen kommen Zellen mit einer oder mehreren Verzweigungen vor (Abb. 2), ferner Kugelzellen von 1—3 μ \varnothing (Abb. 3). Sie entstehen einzeln oder seitlich am Ende von Stäbchen. Die Faktoren, die zur Ausbildung solcher Kugelzellen führen, sind noch unbekannt. Möglicherweise handelt es sich um eine Degeneration der Zellen.

Bei Sternanordnungen sind die Zellen durch ein zartes Netz einer Substanz locker verbunden (Abb. 4), oder sie stoßen mit den Polen aneinander. Die verbindende Substanz wird von einem breiten Bereich der Zellpole in feinen parallelen Strängen abgeschieden. Offenbar handelt es sich um eine Haftsubstanz, wie sie für *Hyphomicrobium* (CONTI und HIRSCH, 1965) und *Caulobacter* (STOVE POINDEXTER, 1964; STOVE POINDEXTER und COHEN-BAZIRE, 1964) beschrieben und abgebildet wurde.

Die Abb. 5 und 6 zeigen Zellpole, an denen die Haftsubstanz abgeschieden wird. Auffällig ist, daß an diesen Stellen die Zellwand besonders scharf konturiert ist.

In dichten Sternanordnungen ist häufig eine kompakte Haftsubstanz zu sehen, die granuliert erscheint. Entsprechend kann auch bei *Caulobacteraceae* die Haftsubstanz homogen oder granuliert aussehen (STOVE POINDEXTER und COHEN-BAZIRE).

Gesetzmäßigkeiten für die Anordnung der Kernsubstanz (DNS) konnten nicht gefunden werden. Meist ist sie bei Schnittansicht in kleinen Portionen über die gesamte Zelle verteilt (Abb. 2, 4, 6). Einige Zellen tragen auch einen zusammenhängenden Kernbereich in der Zellmitte.

Agrobacterium ferrugineum, Stamm A 7

Die Präparate des Stammes A 7 wurden alle von Agarkulturen hergestellt. Unter diesen Bedingungen werden besonders lange Zellen ausgebildet, welche meist schlanker sind als die Kurzstäbchen. Aus den elektronenoptischen Aufnahmen ergaben sich Zellgrößen von 0,3—0,55 $\mu \times 1—7 \mu$.

Geißeln wurden bei dieser Behandlung nicht gefunden. Dagegen ließen sich mit Geißelfärbungen vereinzelte Geißeln nachweisen (AHRENS und RHEINHEIMER, 1967). Die Teilung erfolgt durch Querwandbildung oder durch Einschnürung (Abb. 8, 9, 10) oder durch eine Kombination von beiden Vorgängen (Abb. 12). In Abb. 9 sind die Zellen bis auf die Zellwand schon völlig getrennt. Möglicherweise kommen so die Hantelformen und unsichtbaren Verbindungen zustande, die früher für die Stämme A 5 und A 7 beschrieben wurden (AHRENS und RHEINHEIMER, 1967). Durch die Teilung entstehen häufig winkelige Anordnungen, die an die Schnappteilung der *Corynebacterium*-Arten erinnern (Abb. 8, 10, 12).

Legende zu den nebenstehenden Abbildungen (Tafel 4)

Abb. 11: *Agrobacterium ferrugineum* A 7.

ZoBell-Schrägagar, 3 Tage.

Ultradünnschnitt durch eine kompakte Rosettengruppe. Die einzelnen Zellen sind deutlich mit einer Zellwand gegeneinander abgegrenzt. Die DNS ist in unregelmäßigen Portionen über die Zellen verteilt. 17100 \times .

Abb. 12: *Agrobacterium ferrugineum* A 7.

ZoBell-Schrägagar, 3 Tage. Zellen fixiert und mit Pt/C schräg bedampft.

Die feinen Verbindungsstränge im Sternzentrum stellen möglicherweise Konjugationsbrücken dar. 13400 \times .

Gelegentlich wurden am peripheren Pol von Sternzellen keine Knospen gefunden, die durch asymmetrische Teilung entstanden sein können.

Verzweigungen und die bei A 5 beschriebenen Kugelzellen wurden auch bei A 7 nachgewiesen. Im Ultradünnschnitt erweisen sich solche Kugelzellen als sehr DNS-haltig; in einem Fall war eine Hälfte von einer Vakuole ausgefüllt; in einem anderen Fall hafteten an einer Kugelzelle mehrere Stäbchenzellen.

Entsprechend wie bei A 5 waren die Rosetten locker oder dicht gefügt. In bedampften Präparaten ganzer Zellen konnten Zellverschmelzungen vorgetäuscht werden. In unbedampften Präparaten oder in Schnitten waren die Zellgrenzen stets deutlich sichtbar (Abb. 11).

Die Haftsubstanz erschien amorph (Abb. 9, 10) bis granulär.

Die Kernsubstanz war in mehr oder weniger großen Zonen über die Zelle verteilt. Eine eindeutige Konzentrierung im Sternzentrum konnte nicht beobachtet werden (Abb. 10, 11).

Feine Verbindungsstränge zwischen den Zellen einer lockeren Sterngruppe könnten als Konjugationsbrücken gedeutet werden (Abb. 12), (WOLLMANN, JACOB und HAYES, 1956). Möglicherweise handelt es sich aber auch nur um Schleimstränge.

Agrobacterium luteum, Stamm A 61

Die Zellen sind eiförmige bis langgestreckte Stäbchen von $0,3-0,6 \mu \times 0,6-1,5 \mu$.

Die Teilung erfolgt durch Querwandbildung (Abb. 18) oder durch Einschnürung, meist durch eine Kombination beider Vorgänge. Durch die Einschnürung entstehen zugespitzte Zellpole (Abb. 14, 16).

Die Zellen besitzen 1—4 zarte Geißeln, die meist polar angeordnet sind (Abb. 14, 16). An den Polen sitzt auch häufig ein Bündel feiner Fimbrien (Abb. 13, 14), wie sie für einen sternbildenden *Pseudomonas*-Stamm beschrieben und abgebildet wurden (MARX und HEUMANN, 1962; HEUMANN und MARX, 1964). Die Abb. 13 könnte ein frühes Sternstadium sein, in dem sich die Zellen mit Hilfe der Fimbrien aneinander festheften. Entsprechend dem *Pseudomonas*-Stamm von MARX und HEUMANN trägt stets nur ein Pol Fimbrien. Die Unterscheidung zwischen Geißeln und Fimbrien ist nicht immer einfach.

Die Kernsubstanz nimmt einen großen Bereich der Zelle ein (Abb. 17, 18). Meist liegt ein einheitlicher Chromatinkörper vor. Eine Verlagerung zum Sternzentrum kann nicht beobachtet werden.

Sternanordnungen sind in eine Haftsubstanz eingebettet, die offenbar von den Zellpolen ausgeht. In einem Fall war die Substanz zu einem langen Band ausgezogen (Abb. 15), an dem die einzelnen Zellen mit ihren Polen aufgehängt waren. Diese Anordnung entspricht dem früher beschriebenen „Schleimfaden“ (AHRENS und RHEINHEIMER, 1967; HEUMANN, 1956).

Im Zentrum von Rosettengruppen oder an Stellen, wo sich einzelne Zellen mit den Polen berühren, befinden sich Granula von sehr konstanter Größe. Sie sind in Präparaten

Legende zu den nebenstehenden Abbildungen (Tafel 5)

Abb. 13: *Agrobacterium luteum* A 61.

Flüssiges ZoBell-Medium, 3 Tage. Zellen fixiert und mit Pt/C schräg bedampft. Beginnende Sternbildung. Die Fimbrienschöpfe liegen zur Sternmitte. $36\,700 \times$.

Abb. 14: *Agrobacterium luteum* A 61.

Flüssiges ZoBell-Medium, 3 Tage. Zellen fixiert und mit Pt/C schräg bedampft. Zellgruppe mit Geißeln und Fimbrien. Die Zelle am Bildrand trägt offenbar ein Geißelbündel; die zwei anderen Zellen sind monotrich begeißelt. $15\,000 \times$.

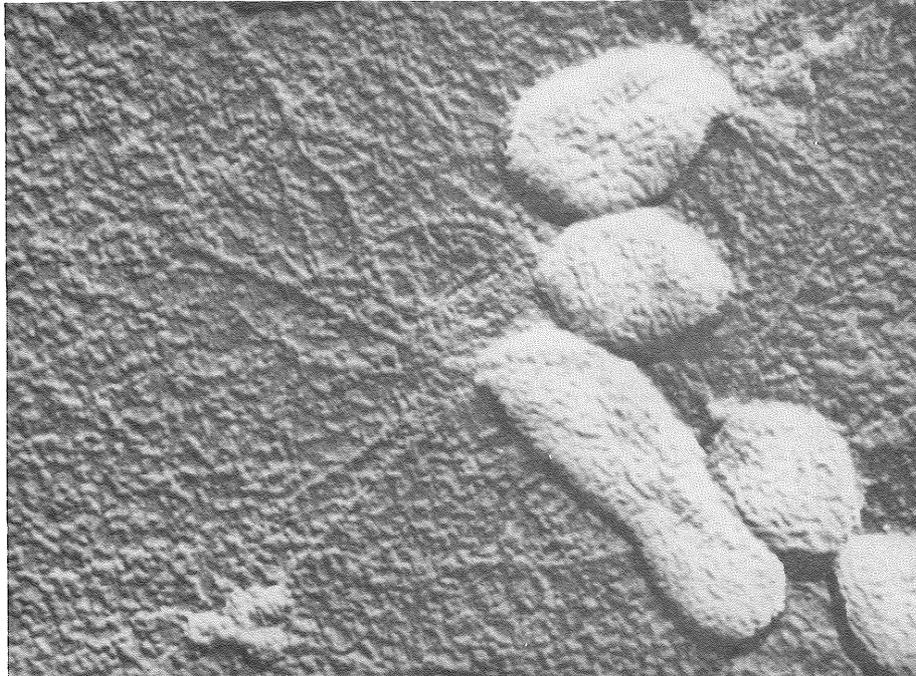


Abb. 13

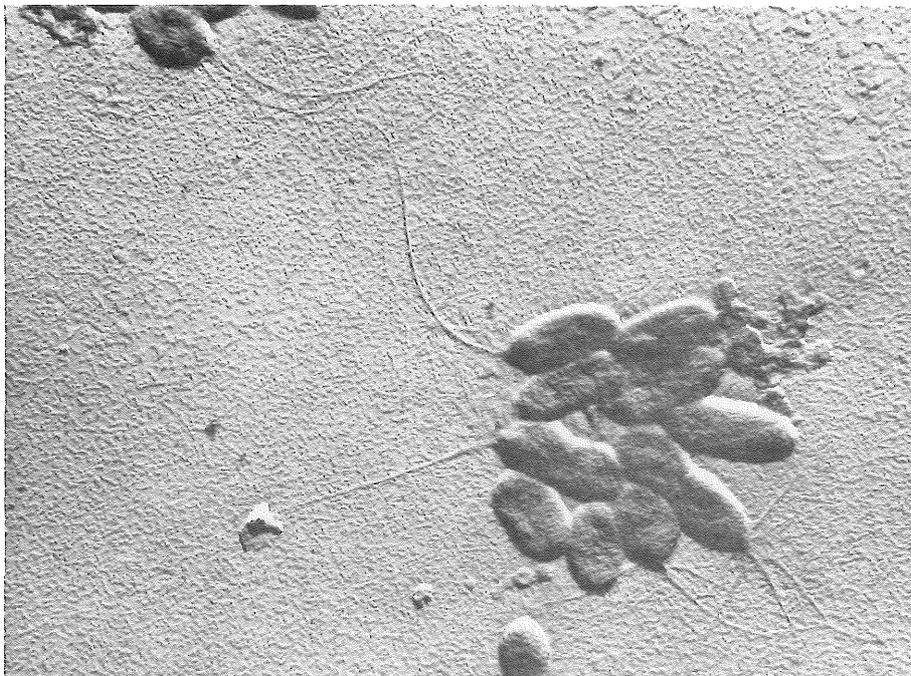


Abb. 14

Tafel 5 (zu G. Moll, R. Ahrens u. G. Rheinheimer)



Abb. 15

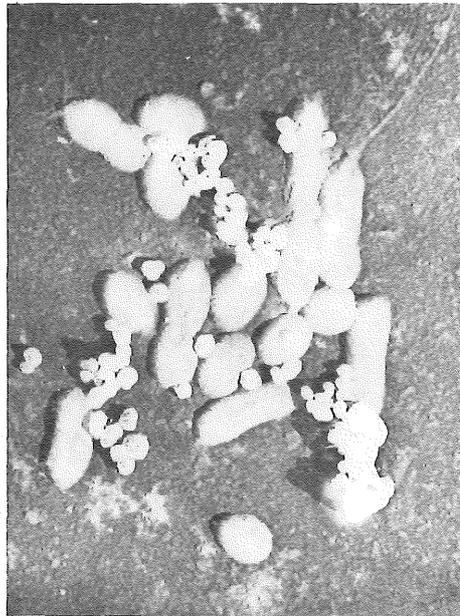


Abb. 16

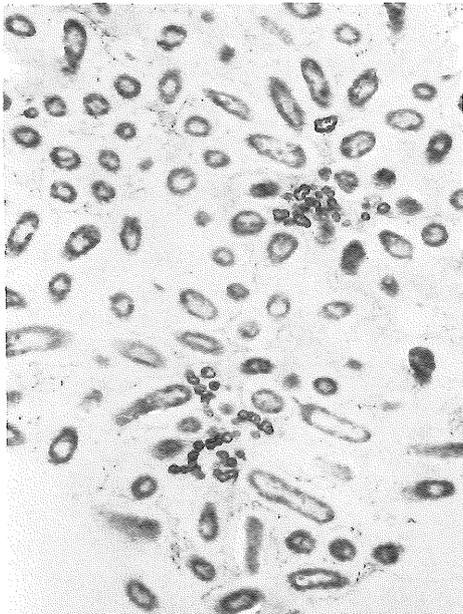


Abb. 17

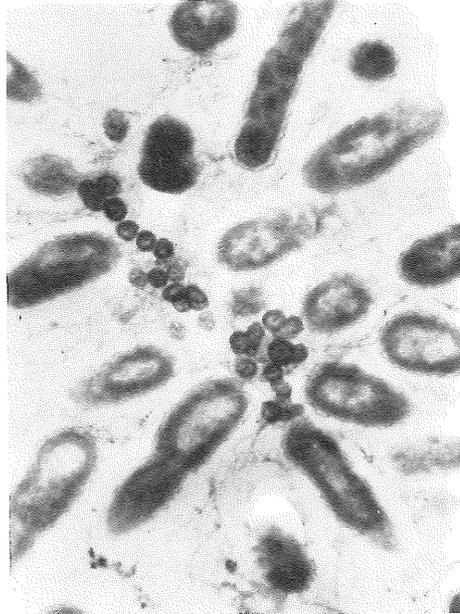


Abb. 18

ganzer Zellen (Abb. 16) vorhanden, auch wenn diese unbedampft sind, und in Ultradünnschnitten (Abb. 17, 18).

Ihre Größe beträgt $0,07\ \mu$ — $0,23\ \mu$, meist $0,12\ \mu$. Die Oberfläche ist fein porös (Abb. 16). In Ultradünnschnitten erkennt man zwei Zonen, eine elektronendichte äußere Zone und ein helleres Zentrum (Abb. 17, 18). Möglicherweise ist die innere Zone DNS-haltig; dies ist aber nach den bisherigen Untersuchungen noch nicht sicher.

Eine Reihe von Aufnahmen läßt es möglich erscheinen, daß die Granula aus den Zellen abgegeben werden, besonders in Polnähe. In einem unbedampften Präparat enthielt eine Zellgruppe im Pol jeweils eine rundliche dunkle Zone, die den übrigen Zellen fehlte; dafür befand sich aber außerhalb der Pole jeweils eine Gruppe ebenfalls dunkler Granula. Im bedampften Präparat sind die Zonen innerhalb der Zellen noch zu erkennen, wenn auch nicht so deutlich (Abb. 14, 16).

Granula dieser Art wurden bisher nicht im Zusammenhang mit der Sternbildung beschrieben oder abgebildet. Schließt man die Möglichkeit aus, daß es sich um Partikel aus dem Nährmedium handelt, die als „Kondensationskerne“ bei der Sternbildung dienen, so könnte man eine Beziehung zwischen Austauschvorgängen der Sternzellen und der Entstehung der Granula suchen. Es wäre denkbar, daß sie zu normalen Zellen heranwachsen. Einige Ultradünnschnitte könnten in diesem Sinn gedeutet werden. Weitere Untersuchungen über die Bedeutung der Granula sind vorgesehen.

Diskussion

Ziel der Untersuchung war es, u. a. in den Sternformen eine etwaige Kernverschmelzung nachzuweisen, wie sie für Agrobakterien so häufig postuliert und beschrieben wurde (STAPP, 1942; STAPP und KNÖSEL, 1954, STAPP und KNÖSEL, 1956 a, b; KNÖSEL, 1963). Bei dem sternbildenden *Pseudomonas rhodos* (Stamm B 6) sollen jeweils zwei Zellen verschmelzen (HEUMANN, 1956). Elektronenoptische Aufnahmen ganzer Zellen in bedampften Präparaten ließen bei Sternen von *Agrobacterium stellulatum* Stamm A 5 und *Agrobacterium ferrugineum* Stamm A 7 zuweilen den Eindruck einer Zellverschmelzung entstehen. Eine genaue Beantwortung der Frage darf man nur von Ultradünnschnitten erwarten. Obwohl in zahlreichen Schnitten Sterne nahezu in der Mitte getroffen waren, konnte in keinem Fall ein Hinweis auf eine Zellverschmelzung gewonnen werden. Ultradünnschnitte durch Sternverbände von *Agrobacterium* sind bisher nicht veröffent-

Legende zu den nebenstehenden Abbildungen (Tafel 6)

- Abb. 15: *Agrobacterium luteum* A 61.
Verdünntes ZoBell-Medium ($3/10$ konzentriert), 4 Tage.
Die Zellen sind mit den Polen an der langgestreckten Haftsubstanz aufgehängt. $7400\times$.
- Ann. 16: *Agrobacterium luteum* A 61.
Flüssiges ZoBell-Medium, 3 Tage. Zellen fixiert und mit Pt/C schräg bedampft.
Zellen und „Granula“. Man beachte die fein poröse Oberfläche der Granula. $8650\times$.
- Abb. 17: *Agrobacterium luteum* A 61.
Verdünntes ZoBell-Medium ($3/10$) konzentriert, 4 Tage.
Ultradünnschnitt durch zwei Rosettengruppen. Neben den Granula befindet sich im Sternzentrum eine lockere Haftsubstanz. $8800\times$.
- Abb. 18: *Agrobacterium luteum* A 61.
Verdünntes ZoBell-Medium ($3/10$ konzentriert), 4 Tage.
Ultradünnschnitt durch ein Sternzentrum. Die Granula weisen einen dünnen zweischichtigen Aufbau auf. Die Haftsubstanz steht mit den Zellpolen in Verbindung. — In den großflächigen hellen Zonen sind DNS-Fäden erkennbar. $18000\times$.

licht worden. BRAUN und ELROD (1946) konnten in einer elektronen-optischen Untersuchung von *Agrobacterium tumefaciens* ebenfalls keine Zellverschmelzung feststellen.

Da sich eine Zellverschmelzung bei der Sternbildung nicht eindeutig nachweisen läßt, ist es unwahrscheinlich, daß die Kernsubstanz zu einem einheitlichen Kern zusammenfließt und daß dieser Verschmelzungskern anschließend wieder in Einzelkerne zerfällt, wie dieses von STAPP (1942) für *Agrobacterium tumefaciens* beschrieben wurde.

Will man bei der Sternbildung einen Sexualakt annehmen, so müßte die DNS durch Poren in der Zellwand abgegeben werden, so daß es sich bei diesem Vorgang um eine Transformation handeln würde. Eine andere Möglichkeit wäre eine Genübertragung durch Konjugation. Bei *Agrobacterium ferrugineum* Stamm A 7 konnten Verbindungen zwischen Sternzellen nachgewiesen werden (Abb. 12), die den Konjugationsbrücken von WOLLMANN et al. (1956) ähnlich sehen. In unseren Ultradünnschnittserien fanden wir jedoch niemals Konjugationsbrücken.

Unklar war bisher die Art der Verklebung der Einzelzellen im Sternverband. Frühere Autoren berichteten, daß mit der Sternbildung eine starke Schleimabscheidung einhergeht (STAPP und BORTELS, 1931; STAPP, 1942). BRAUN und ELROD (1946) wiesen für *Agrobacterium tumefaciens* elektronenoptisch nach, daß sich im Zentrum der Sterne eine Substanz befindet, die etwa die gleiche Dichte besitzt wie die Bakterien selbst und als Abscheidung von Schleim oder von Protoplasma gedeutet wurde.

Sterne von *Agrobacterium stellulatum*, *Agrobacterium ferrugineum* und *Agrobacterium luteum* besitzen im Zentrum eine ähnliche Substanz. Diese ist in Ultradünnschnitten besonders gut sichtbar (Abb. 4, 5, 6, 10, 17, 18), aber auch in ungeschnittenen Sternen ist sie deutlich zu erkennen (Abb. 9). Die Substanz ist homogen, fein granulär oder grobkörnig. Es handelt sich um eine Abscheidung der Zellen, die an den Polen wie aus zahlreichen feinen Poren abgegeben wird. Die Zellwand ist an diesen Stellen glatt (Abb. 5, 6). Zwischen Zellwand und cytoplasmatischer Membran ist eine Anhäufung der Substanz zu sehen (Abb. 5). Das Material stimmt in Entstehung, Anordnung und Struktur mit der Haftsubstanz sternbildender gestielter Bakterien überein und soll daher ebenfalls als Haftsubstanz (holdfast) bezeichnet werden. *Caulobacter*-Arten sezernieren die Haftsubstanz an der Stielspitze, *Asticcacaulis*-Arten an dem stieltragenden Zellpol. Menge und Form der Substanz sind für die einzelnen *Caulobacter*-Arten unterschiedlich. Die dichteste Anhäufung erfolgt im Zentrum der Rosetten. Auch die Struktur ist artverschieden. Sie erscheint in elektronenoptischen Schnitten amorph und dunkel gefärbt, grobkörnig oder fast auch fibrillär (STOVE POINDEXTER und COHEN-BAZIRE, 1964). In einem Fall erschien sie als Masse von dunkel gefärbten runden Partikeln von 0,01—0,013 μ \varnothing (STOVE POINDEXTER, 1964) (s. auch PATE und ORDAL, 1965).

Auch die Haftsubstanz der sternbildenden Hyphomikrobien zeigt eine gewisse Ähnlichkeit mit derjenigen der *Agrobacterium*-Arten (CONTI und HIRSCH, 1965).

Die Haftsubstanz der Agrobakterien kann offenbar auch eine langgestreckte Form annehmen, so daß die Einzelzellen wie an einem Band aufgereiht sind (Abb. 15). Es handelt sich wohl um die gleiche Erscheinung, die als Raupenform beschrieben wird.

Neben den peritrichen Fimbrien der Enterobakterien (s. BRINTON, 1959) finden sich bei einigen Bakteriengruppen auch polar angeordnete Filamentbüschel (HAMPP et al., 1960; HOUWINK, 1955; MARX und HEUMANN, 1962; HEUMANN und MARX, 1964).

Allgemein kommt den Fimbrien die Bedeutung von Haftorganellen zu, die den Zellen z. B. das Haften an Oberflächen ermöglichen und Hämagglutination bewirken.

Die Fimbrien von *Agrobacterium luteum* gehören dem zweiten Typ an. Jeweils ein Zellpol trägt ein Büschel zarter Fasern. In einem jungen Sternstadium sind sie zum Zentrum ausgerichtet. Die Anordnung legt die Vermutung nahe, daß die Fimbrien für die Entstehung der Sterne wichtig sind. Sie könnten als kontraktile Fasern die Zellen zueinander

ziehen und miteinander befestigen. Diese Annahme wird durch den äußeren Ablauf der Sternbildung gestützt. Die Fimbrienpräparate von *Agrobacterium luteum* stammen aus einer jungen flüssigen Kultur, in der die Zellen in lebhafter Sternbildung begriffen waren. Der Ablauf konnte im Lichtmikroskop mehrmals verfolgt werden. Einzelne Zellen hatten sich am Deckglas festgeheftet. Andere bewegten sich frei in großen Spirallinien über das Gesichtsfeld. In der Nähe von größeren Zellgruppen wurden Einzelzellen festgehalten. Dann bewegten sie sich in mehreren Etappen geradlinig sehr rasch auf das Sternzentrum zu. Die Zellen im Umkreis eines Sternansatzes waren meist radiär ausgerichtet. Die beste Erklärung für den Vorgang scheint die, daß um die Zellgruppen lange Fimbrien ausgelegt waren, an denen sich hinzukommende Zellen verfangen. Durch eine rasche Kontraktion der Fasern wanderten die Einzelzellen auf die Gruppe zu. Eine aktive Bewegung ist nicht anzunehmen, da diese purzelnd auf Spirallinien erfolgt.

MARX und HEUMANN (1962) und HEUMANN und MARX (1964) haben die Fimbrien des Sternbildners *Pseudomonas echinoides* eingehend untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß sie jeweils an einem Pol zu einem Büschel angeordnet sind. Der fimbrientragende Pol liegt dem begeißelten Pol gegenüber und im Stern zentral. Die Fimbrien besitzen die Fähigkeit zur Kontraktion. Kontrahierte und gestreckte Fimbrien sehen elektronenoptisch unterschiedlich aus. Mutanten von *Pseudomonas echinoides*, die die Fähigkeit der Sternbildung verloren haben, weisen nur gestreckte Fimbrien auf. Die Sternbildung ist offenbar von der Kontraktion abhängig. Eine Beteiligung der Fimbrien an der Sternbildung könnte auch bei *Caulobacter* vorliegen. HOUWINK (1955) hat eine Reihe von *Caulobacter*-Zellen abgebildet, die an der Stielspitze ein Filamentbüschel tragen. Dies ist die Stelle, an der sich die Zellen im Sternverband miteinander befestigen. Im Gegensatz zu *Pseudomonas echinoides* ist bei *Caulobacter* der fimbrientragende Pol zugleich der begeißelte Pol. Allerdings wird die Geißel bei der Ausbildung des Stieles abgeworfen.

Die Bedeutung der Blaszellen, die bei *Agrobacterium stellulatum* und *Agrobacterium ferrugineum* gefunden wurden, ist noch unklar. Obwohl sie gelegentlich in jungen Kulturen auftraten, könnte es sich um eine Form der Degeneration handeln. Nach ZIEGLER (1958) bildet ein sternbildendes *Rhizobium* („*Bacterium radicum*“) blasige Auftreibungen, die im Elektronenbild an die von *Agrobacterium stellulatum* erinnern. Sie wurden ebenfalls als Degenerationsformen gedeutet. Ähnliche Blaszellen scheinen auch bei anderen Bakterienarten nicht selten zu sein. Sie traten z. B. bei *Bacillus mycoides* auf (STAPP und ZYCHA, 1931) und wurden bei *Pseudomonas malvacearum* als Kokkenformen beschrieben (STOUGHTON, 1929, 1932).

Die Deutung der Granula in den Sternen von *Agrobacterium luteum*, Stamm A 61, ist schwierig. Die sehr konstante Größe und Struktur sprechen gegen die Annahme, daß es sich um Partikel aus dem Nährmedium handelt. Wie aus den Ultradünnschnitten deutlich hervorgeht, bestehen die Granula aus zwei Schichten. Daher können es auch kaum abgeschiedene Stoffwechselprodukte sein. Es liegt nahe, an Fortpflanzungsstadien zu denken.

In der Literatur finden sich zahlreiche Angaben über verschiedene Typen von Schwärmzellen und Gonidien, die aber nicht mit den Granula von *Agrobacterium luteum* vergleichbar sind. BISSET und HALE (1951) beschrieben für *Rhizobium*-Stämme die Ausbildung kleiner begeißelter Schwärmer, die im Lumen der „barred“ Stäbchen gebildet werden und durch Aufbrechen der Mutterzelle frei werden. Diese Schwärmer sollen möglicherweise konjugieren und anschließend zu vegetativen Zellen heranwachsen. Aus den Abbildungen ergeben sich Größen von ca. $0,6 \times 1,2 \mu$. Größe und Begeißelung schließen jedoch eine Deutung der „Granula“ von *Agrobacterium luteum* als entsprechende Schwärmer aus. Die elektronenoptischen Aufnahmen der Schwärmer legen überdies die

Vermutung nahe, daß es sich um kleine vegetative Zellen handelt. Länge und Wellenlänge der Geißeln entsprechen durchaus den Größenangaben für Rhizobien.

Gelegentlich werden bei *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Vibrio* und einigen Spirillen kleine als Gonidien bezeichnete Fortpflanzungsstadien beschrieben (s. BISSET, 1956; PEASE, 1956). Sie sind beweglich; die Art ihrer Entstehung ist ungeklärt. Bei *Azotobacter chroococcum* sollen die vegetativen Zellen befähigt sein, Gonidien zu bilden, die zwei verschiedenen Typen angehören können. Entweder handelt es sich um eine Vielzahl kleiner Stäbchen mit 1—5 polaren Geißeln; die Stäbchen können sich querteilen — oder es handelt sich um einzelne größere Gonidien, die unbegeißelt sind, wie kleine *Azotobacter*-Zellen aussehen und zu vegetativen Zellen heranwachsen (BISSET und HALE, 1953). Auch mit diesen Gonidien sind die „Granula“ von *Agrobacterium luteum* nicht vergleichbar.

Bei einigen Spirillum-Arten schwellen die Zellen zu „Zysten“ an. Aus den Zysten werden kleine vibrioformige Zellen mit einer polaren Geißel frei. Diese kleinen Zellen wachsen zu vegetativen Zellen heran. Bei *Spirillum serpens* waren die freiwerdenden Elemente unbegeißelt und vermehrten sich unter der Einwirkung von Penicillin zu kleinen Kolonien aus runden Gebilden (PEASE, 1956).

HOFFMAN und FRANK (1965) fanden in Mikrokulturen von *Escherichia coli* und *Corynebacterium* kleine runde „Granula“, die für die Schnappbewegung verantwortlich sein sollen.

Die Struktur der Granula von *Agrobacterium luteum* ist gewissen Viren nicht unähnlich. Allerdings liegt die Größe von Viren meist erheblich unter 0,2 μ . Außerdem müßte es sich im vorliegenden Fall um Bacteriophagen handeln. Da aber nie eine Beeinträchtigung des Wachstums festzustellen und nie eine Kultur lysiert war, dürfte die Deutung der Granula als Phagen ausscheiden.

Die Entstehung und Bedeutung der Granula von *Agrobacterium luteum* bleibt also noch unklar. Denkbar wäre folgende Möglichkeit: Bei der Sternbildung wird zwischen den Zellen auf irgendeine noch ungeklärte Weise Kernmaterial ausgetauscht. Als Folge dieses Kopulationsvorganges werden kleine Fortpflanzungsstadien abgegeben, die zu normalen Zellen heranwachsen können.

Literaturverzeichnis

- AHRENS, R. und RHEINHEIMER, G. (1967): Über einige sternbildende Bakterien aus der Ostsee. Kieler Meeresforsch. Im Druck. — BISSET, K. A. (1956): Cellular organisation in bacteria. In: Bacterial Anatomy, SPOONER, E. T. C. und STOCKER, B. A. D., Hrsg. 6th. Symp. of the Society for General Microbiol., S. 1—18. Cambridge Univ. Press, London und New York. — BISSET, K. A. und HALE, C. M. F. (1951): The production of swimmers in *Rhizobium* spp. J. gen. Microbiol. 5, 592
- BISSET, K. A. und HALE, C. M. F. (1953): The cytology and life — cycle of *Azotobacter chroococcum*. J. gen. Microbiol. 8, 442—448. — BRAUN, A. C. und ELROD, R. P. (1946): Stages in the life history of *Phytomonas tumefaciens*. J. Bact. 52, 695—702. — BRINTON, C. C. (1959): Non-flagellar appendages of bacteria. Nature 183 (4664), 782—786. — CONTI, S. F. und HIRSCH, P. (1965): Biology of budding bacteria. III. Fine structure of *Rhodomicrobium* and *Hyphomicrobium*. J. Bact. 89, 503—512. — GIESBRECHT, P. (1962): Vergleichende Untersuchungen an den Chromosomen der Dinoflagellaten *Amphidinium elegans* und denen der Bakterien. Zblt. Bakt., Abt. I, Orig. 187, 452. — HAMPP, E. G., SCOTT, D. B. und WYCKOFF, R. W. G. (1960): Morphological characteristics of oral Fusobacteria as revealed by the electron microscope. J. Bact. 79, 716—728. — HEUMANN, W. (1956): Der Sexualcyclus sternbildender Bakterien. Arch. Mikrobiol. 24, 362—395. — HEUMANN, W. und MARX, R. (1964): Feinstruktur und Funktion der Fimbrien bei dem sternbildenden Bakterium *Pseudomonas echinoides*. Arch. Mikrobiol. 47, 325—337. — HOFFMAN H. und FRANK, M. E. (1965): Time — lapse photomicrography of lashing, flexing and snapping movements in *Escherichia coli* and *Corynebacterium* microcultures. J. Bact. 90, 789—795. — HOUWINK, A. L. (1955): Caulobacter. Its morphogenesis, taxonomy and parasitism. Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol. 21, 49—64. —

KELLENBERGER, E. und RYTER, A. (1955): Contribution á l'étude du noyau bactérien. Schweiz. Z. allgem. Path. Bakt. **18**, 1122. — KNÖSEL, D. (1963): Karyologische Untersuchungen an sternbildenden Bakterien vermittels Färbe- und enzymatischer Verfahren, phasen- und elektronenoptisch. Zblt. Bakt., Abt. II, **116**, 113—130. — MARX, Ruth und HEUMANN, W. (1962): Über Geißelfeinstrukturen und Fimbrien bei zwei Pseudomonas-Stämmen. Arch. Mikrobiol. **43**, 245—254. — PATE, J. L. und ORDAL, E. J. (1965): The fine structure of two unusual stalked bacteria. J. Cell Biol. **27**, 133—150. — PEASE, P. E. (1956): The gonidial stages in *Spirillum spp.* and *Vibrio spp.* J. gen. Microbiol. **14**, 672 to 675. — REYNOLDS, E. S. (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. **17**, 208. — STAPP, C. (1942): Der Pflanzenkrebs und sein Erreger *Pseudomonas tumefaciens*. XI. Mitteilung: Zytologische Untersuchungen des bakteriellen Erregers. Zblt. Bakt., Abt. II, **105**, 1—14. — STAPP, C. und BORTELS, H. (1931): Der Pflanzenkrebs und sein Erreger *Pseudomonas tumefaciens*. II. Mitteilung: Über den Lebenskreislauf von *Ps. tumefaciens*. Zschr. Parasitenk. **4**, 101—125. — STAPP, C. und KNÖSEL, D. (1954): Zur Genetik sternbildender Bakterien. Zblt. Bakt., Abt. II, **108**, 243—259. — STAPP, C. und KNÖSEL, D. (1956a): Phasenoptisch-cytologische Untersuchungen sternbildender Bakterien. Zblt. Bakt., Abt. II, **109**, 25—41. — STAPP, C. und KNÖSEL, D. (1956b): Fortgeführte Untersuchungen über den Entwicklungscyclus und die Karyologie sternbildender Bakterien. Zblt. Bakt., Abt. II, **109**, 416—428. — STAPP, C. und ZYGHA, H. (1931): Morphologische Untersuchungen an *Bacillus mycoides*; ein Beitrag zur Frage des Pleomorphismus der Bakterien. Arch. Mikrobiol. **2**, 493—536. — STOUGHTON, R. H. (1929): The morphology and cytology of *Bacterium malvacearum*, E. F. S. Proc. Roy. Soc., Ser. B, **105**, 469—484. — STOUGHTON, R. H. (1932): The morphology and cytology of *Bacterium malvacearum*, E. F. S. Part II. Reproduction and cell-fusion. Proc. Roy. Soc., Ser. B, **111**, 46—52. — STOVE POINDEXTER, JEANNE (1964): Biological properties and classification of the Caulobacter group. Bactl. Rev. **28**, 231—295. — STOVE POINDEXTER, J. L. und COHEN-BAZIRE, G. (1964): The fine structure of stalked bacteria belonging to the family Caulobacteraceae. J. Cell Biol. **23**, 587—607. — WOLLMANN, E.-L., JACOB, F. und HAYES, W. (1956): Conjugation and genetic recombination in *Escherichia coli* K-12. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **21**, 141—162. — ZIEGLER, H. (1958): Elektronenmikroskopische Untersuchungen von symbiontischen Bakterien aus höheren Pflanzen. Z. Naturforsch. **13b**, 297—301.