

tions if one group comes from the moon and another from Mars or the asteroids, but the great similarities in composition and morphology strongly suggest very similar places of origin.

9. The orbit of the Pribram meteorite extends into the asteroidal belt and this suggests an asteroidal origin. At present our understanding of these orbits leads to no firm conclusions in regard to the origin of meteorites.

10. During the last 10 years a postulated origin for the moon has been developed which is consistent with a lunar origin for many of the meteorites.

*Acknowledgments.* Support for this research came from the Atomic Energy Commission on Contract AT (11-1)-34, Project 43, and is gratefully acknowledged. This is Report No. UCSD-34 P 43-14.

[1] ANDERS, E.: Space Sci. Rev. 3, 583 (1964). — [2] ARNOLD, J. R.: Astrophys. J. 141, 1548 (1965). — [3] ARNOLD, J. R., and S. R. TAYLOR: (1967, in press). — [4] BEGEMANN, F.: Paper presented at Mainz Symposium, May 1967. — [5] BERZELIUS, J. J.: Ann. Phys. Chem. 33, 113 (1834). — [6] CAMERON, A. G. W.: Preprint (1967). — [7] CEPLECHA, Z.: Bul. Astron. Inst. Czechoslovakia 17, 195 (1966). — [8] CEPLECHA, Z.: ibid. 12, 21 (1960). — [9] CLÖEZ, S.: Compt. rend. 59, 37 (1864). — [10] EBERHARDT, P., et al.: Earth & Planet. Sci. Letters 1, 7 (1966). — [11] EBERHARDT, P., et al.: Tschemaks mineralog. petrog. Mitt. 10, 535 (1965). — [12] FREDRIKSSON, K., and P. DeCARLI: J. geophys. Res. 69, 1403 (1964). — [13] FRENCH, B. M.: Science 156, 1094 (1967). — [14] GILVARRY, J. J.: a) Nature 188, 886 (1960). — b) Current Aspects of Exobiology. Ed. by G. MAMIKUNIAN and M. BRIGGS. Chapt 5, 179—241. New York: Pergamon Press 1964. — [15] GOLD, T.: Paper presented at Seattle meeting of American Geophysical Union (1964). — [16] GOLD, T.: Mon. Not. R.A.S. 115, 585 (1965). — [17] HEACOCK, R. L., G. P. KUIPER, E. M. SHOEMAKER, H. C. UREY, and E. A. WHITAKER: a) NASA Tech. Rept. 32—800, Jet Propulsion Laboratory, Rangers 8 & 9 (1966). — b) NASA Tech. Rept. 32—700, Jet Propulsion Laboratory, Ranger 7 (1965). — [18] HEYMANN, D.: Preprint (1967). —

[19] HEYMANN, D., and E. ANDERS: Preprint (1967). — [20] HEYMANN, D., and E. MAZOR: (1967, in press). — [21] HINTENBERGER, H., et al.: Z. f. Naturforsch. 19a, 327 (1964). — [22] KIRSTEN, T., et al.: Geochim. Cosmochim. Acta 27, 13 (1963). — [23] KOPAL, Z., in: The Moon. p. 24. London: Chapman & Hall 1963. — [24] LEWIS, J. S.: Earth & Planet. Sci. Letters 2, 29 (1967) and private communication. — [25] LIN, S. C.: J. geophys. Res. 71, 2427 (1966). — [26] MACRAE, D. A.: Paper presented at American Astronomical Society meeting, Montreal, December 1965. — [27] MARTI, K.: Earth & Planet. Sci. Letters 2, 193 (1967). — [28] MASON, B.: Meteorites. New York-London: J. Wiley 1962. — [29] MILLER, S. L., and H. C. UREY: Science 130, 245 (1959). — [30] PISANI, F.: Compt. rend. 59, 132 (1864). — [31] ROWE, M. W. et al.: Geochim. Cosmochim. Acta 27, 983 (1963). — [32] STAUFFER, H.: ibid. 24, 70 (1961). — [33] STAUFFER, H., and H. C. UREY: Bul. Astron. Inst. Czechoslovakia 13, 106 (1962). — [34] SUSS, H., and H. C. UREY: Rev. mod. Phys. 28, 53 (1956). — [35] SUSS, H. E., et al.: Geochim. Cosmochim. Acta 28, 595 (1964). — [36] UREY, H. C.: Icarus (in press). — [37] UREY, H. C.: Quarterly Journ. R.A.S. (in press). — [38] UREY, H. C.: Mon. Not. R.A.S. 131, 199 (1966). — [39] UREY, H. C.: NASA Tech. Rept. 32—800, Rangers 8 and 9, 339—361 (1966) (see especially p. 354). — [40] UREY, H. C.: Rev. Geophys. 2, 1 (1964). — [41] UREY, H. C.: J. Geophys. Res. 64, 1721 (1959). — [42] UREY, H. C.: Proc. Chem. Soc., London, March 1958, p. 67. — [43] UREY, H. C.: Sky & Telescope 15, 108 and 161 (1956). — [44] UREY, H. C., and H. CRAIG: Geochim. et Cosmochim. Acta 4, 36 (1953). — [45] VAN SCHMUS, W. R., and J. A. WOOD: Geochim. Cosmochim. Acta (in press). — [46] WÄHL, W.: ibid. 2, 91 (1952). — [47] WETHERILL, G. W.: J. geophys. Res. 72, 2429 (1967), and private communications. — [48] WHIPPLE, F. W.: Astrophys. J. 113, 464 (1951); see also Proc. Roy. Soc. A 296, 304 (1967). — [49] WIJK, H. B.: Geochim. et Cosmochim. Acta 9, 279 (1956). — [50] ZÄHRINGER, J.: Paper presented at Mainz Symposium, May 1967. — [51] ZÄHRINGER, J.: Z. f. Naturforsch. 17a, 460 (1962). — [52] WÄNKE, H.: Fortschr. chem. Forsch. 7, 322 (1966).

Received July 7, 1967

## *Bdellovibrio bacteriovorus* — ein räuberischer Bakterienparasit

H. STOLP

Biologische Bundesanstalt, Institut für Bakteriologie, Berlin-Dahlem

### *Parasiten und Prädatoren*

In ihrer natürlichen Umgebung stehen die verschiedensten Organismen des Tier- und Pflanzenreichs — höher organisierte Formen und Mikroorganismen — in vielfältigen Wechselbeziehungen zueinander, die in ihrer Gesamtheit das „biologische Gleichgewicht“ bestimmen. Die antagonistischen Beziehungen reichen von der Rivalität um Nährstoffe bis zur physischen Vernichtung eines Partners der Lebensgemeinschaft. Besonders auffällige und oftmals dramatische Formen des Antagonismus sind der Parasitismus und die Prädation. Während typische Parasiten ihre Wirte nur schädigen und meistens nicht töten, hat die „räuberische“ Aktivität von Prädatoren im allgemeinen die Vernichtung der Beute zur Folge.

Bei den Bakterien gibt es neben den saprophytischen Formen bekanntlich auch zahlreiche Vertreter, die sich parasitisch ernähren. Sie leben im Inneren von Mensch, Tier oder Pflanze und treten als Krankheits-erreger in Erscheinung. Daß parasitische oder andere Bakterien ihrerseits — als Objekt und in der Rolle des Wirtes — von Parasiten oder Prädatoren befallen

werden können, ist erst durch die Entdeckung von *Bdellovibrio bacteriovorus*, einem obligaten Bakterienparasiten, bekannt geworden.

### *Die Angriffsweise von Bdellovibrio bacteriovorus*

*Bdellovibrio bacteriovorus* (*Bd.*) ist wegen seiner prokaryotischen Natur, der chemischen Zusammensetzung seiner Zellwand, der Struktur seiner Geißel und anderer Merkmale selbst ein Bakterium. Der Organismus besitzt vibrioförmige Gestalt. Seine Größe liegt beträchtlich unter der Durchschnittsgröße von „gewöhnlichen“ Bakterien (Fig. 1 bis 6). *Bd.* hat eine auffallend dicke Geißel (Fig. 4) und ist in wäßriger Umgebung durch extrem hohe Motilität ausgezeichnet.

Die Wechselwirkungen zwischen Parasit und Wirt lassen sich — soweit es Bewegungsvorgänge und morphologisch-strukturelle Veränderungen im Makroreich betrifft — im Phasenkontrast-Mikroskop verfolgen (Fig. 1 bis 3). Wenn Parasiten und anfällige Wirtsbakterien in wäßriger Lösung zusammengebracht werden, kommt es schon nach wenigen Sekun-

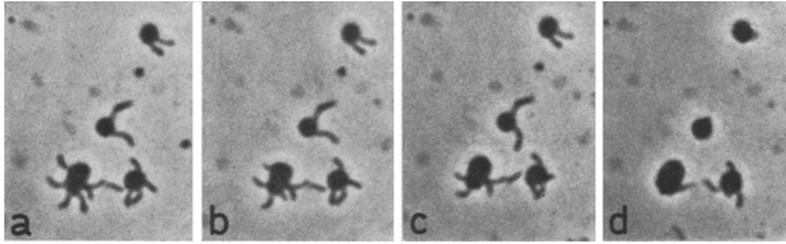


Fig. 1 a—d. Eindringen von *Bdellovibrio bacteriovorus* in Wirtsbakterien (*Salmonella typhimurium*). Zeitlicher Verlauf: a sofort nach Befall; b nach  $3\frac{1}{2}$  min; c nach  $7\frac{1}{2}$  min; d nach 22 min; Phasenkontrast, Vergr. 2073:1

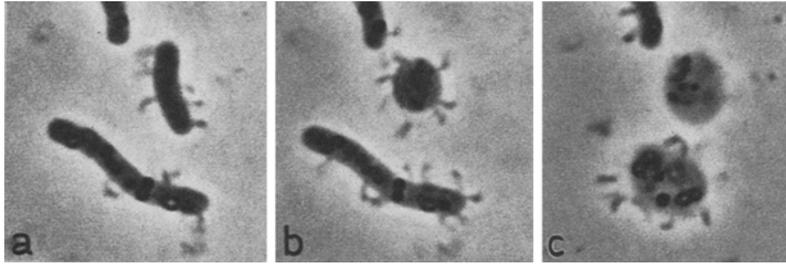


Fig. 2 a—c. Umwandlung von befallenen Zellen in Sphäroplasten (Wirtsbakterium: *Spirillum serpens*). Zeitlicher Verlauf: a sofort nach Befall; b nach 18 min; c nach  $57\frac{1}{2}$  min; Phasenkontrast, Vergr. 2196:1

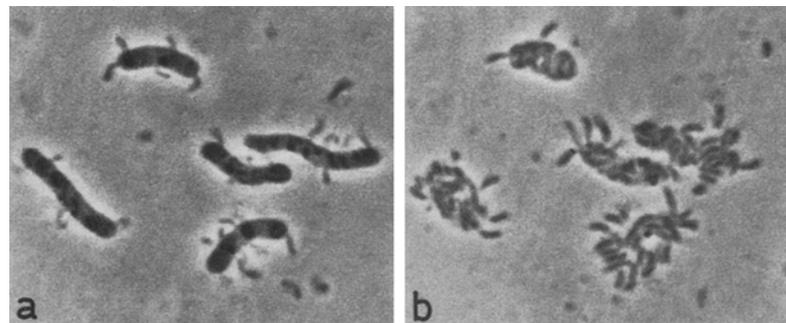


Fig. 3 a u. b. Das Freiwerden von Parasiten aus lysierten Wirtsbakterien (*Spirillum serpens*): a Anfangsstadium unmittelbar nach Befall; b Endstadium nach  $2\frac{1}{2}$  h; Phasenkontrast, Vergr. 1844:1

den zum Befall der Wirtszellen. Die „räuberischen“ Bakterien stürzen sich mit voller Geschwindigkeit auf ihre Beute und klammern sich an ihr fest (Fig. 1 a, 2 a, 3 a und 4). Im weiteren Verlauf dringen die Parasiten in das Zellinnere ein (Fig. 5, 6). In den Serienaufnahmen der Fig. 1 ist zu erkennen, daß einzelne Parasiten schon  $3\frac{1}{2}$  min nach dem Befall der Wirtsbakterien (*Salmonella typhimurium*) weitgehend in das Zellinnere eingedrungen sind (Fig. 1 b, links unten). Nach weiteren 4 min ist das Eindringen deutlich fortgeschritten (Fig. 1 c), und nach 22 min sind fast alle Parasiten im Zellinnern verschwunden (Fig. 1 d). Anfällige Bakterien (Stäbchen, Vibrionen, Spirillen) werden nach dem Befall in kugelige „Sphäroplasten“ überführt (Fig. 2). Im Zellinnern kommt es schließlich zur Vermehrung der eingedrungenen Parasiten. Nach der Lysis der Zellbestandteile und Zerstörung der äußeren „Membran“ werden die Parasiten frei (Fig. 3 b) und können bei Gegenwart anfälliger Wirtsbakterien einen neuen Befallszyklus einleiten.

Durch die Lysis der Bakterien verschafft sich *Bd.* die für seinen Stoffwechsel und seine Vermehrung lebensnotwendigen Nährstoffe. Die Verhaltensweise als „Raubbakterium“, die ernährungsphysiologische Spezialisierung auf den „Verzehr“ von lebenden Bakterien

und andere Besonderheiten unterscheiden diesen Organismus eindeutig von allen bisher bekannt gewordenen Bakterienarten. Als „echter“ Bakterienparasit ist *Bd.* ein bakteriologisches Novum.

Bei der Wirkung von sonstigen „Bakterienfeinden“ haben wir es mit grundsätzlich anderen Formen des Antagonismus zu tun. So werden Bakterien von Protozoen als ganze Zellen „gefressen“ und verdaut oder von Myxobakterien durch Ausscheidungsprodukte abgetötet und für die Ernährung aufgeschlossen. Auch bei der Bakterienlysis durch Bakteriophagen handelt es sich nicht um einen Parasitismus in dem hier verstandenen Sinne. Die Bakteriophagen verursachen zwar vergleichbare lytische Effekte, können wegen ihrer Virusnatur aber nicht mit Organismen verglichen werden, die sich durch eigenen Stoffwechsel, Wachstum, Bewegung und andere Lebensäußerungen als selbständige Individuen auszeichnen.

#### Entdeckung

*Bdellovibrio bacteriovorus* wurde 1962 bei Versuchen entdeckt, die der Isolierung von Bakteriophagen dienten. In einem Bakterienrasen auf festem Nährboden entstehen bei Anwesenheit von Bakteriophagen makroskopisch erkennbare kreisrunde Löcher (Plaques). Hier sind die als Indikator eingesetzten Bakterien durch die von einer virusinfizierten Zelle produzierten und sich nach allen Seiten ausbreitenden Viren lysiert worden.

Durch Zufall wurden auf solchen Isolierungsplatten Plaques gefunden, die sich hinsichtlich ihrer zeitlichen Entwicklung anders verhielten als typische Phagenplaques. Im Gegensatz zu diesen hatte ihre sichtbare Entwicklung erst in der stationären Phase der Wirtsbakterien eingesetzt. Außerdem nahm ihre Größe über einen Zeitraum von mehreren Tagen zu. Das lytische Prinzip ließ sich durch Filter, die für Sterilfiltration geeignet sind (Porengröße 0,2 bis  $0,45\ \mu$ ), von den Indikatorbakterien abtrennen. Mit dem „bakterienfreien“ Filtrat war es möglich, in einem Aktivitätstest — wie mit einer Phagenlösung — die Bildung einzelner Plaques oder, bei höherer Konzentration, konfluierende Lysis zu induzieren. Da das atypische Verhalten der Plaques nicht erklärt werden konnte, wurde schließlich Material aus einem vermeintlichen Phagenplaque im Phasenkontrast-Mikroskop untersucht. Der Blick ins Mikroskop brachte die Erklärung: Die Anwesenheit von räuberischen Parasiten mit bakteriolytischer Aktivität.

Die nähere Untersuchung des ersten, in Berlin isolierten Parasitenstammes zeigte, daß dieser Organismus einen völlig neuen Bakterientyp darstellt [13]. In den ersten Mitteilungen wurde der noch nicht klassifizierte Bakterienantagonist als „obligater Parasit“ ohne

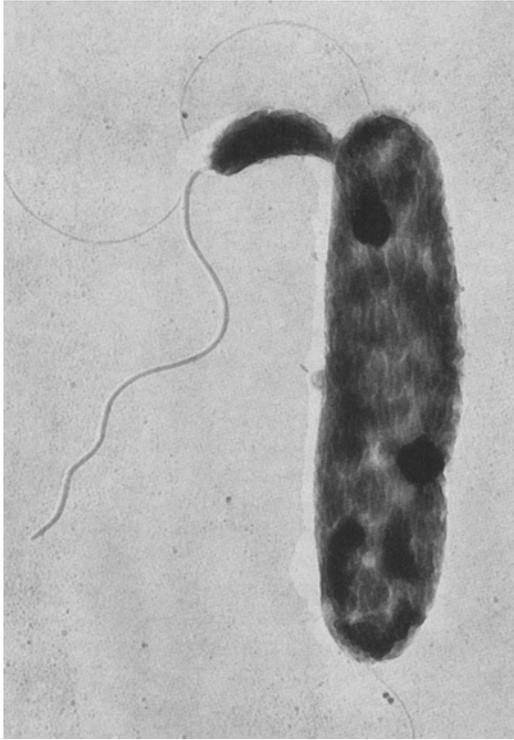


Fig. 4. Primäres Befallsstadium einer Wirtszelle (*Pseudomonas phaseolicola*) durch *Bdellovibrio bacteriovorus*. Elektronenmikroskop; Aufnahmevergr. 8000:1; Endvergr.: 20000:1

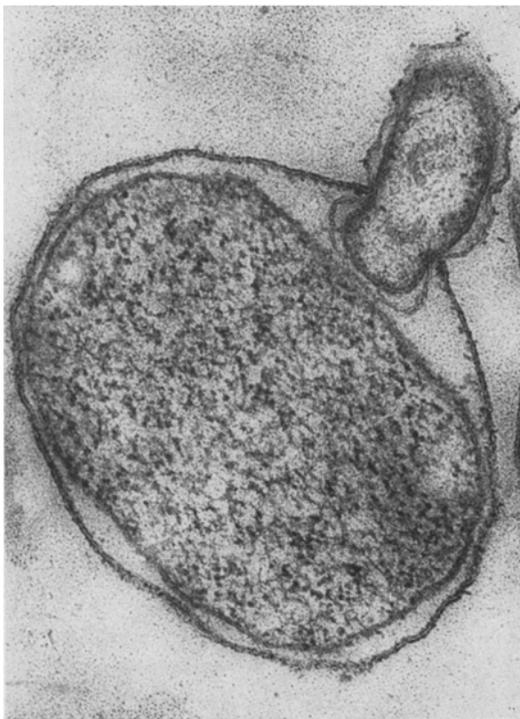


Fig. 5. Eindringen von *Bdellovibrio bacteriovorus* in eine Wirtszelle (*Pseudomonas fluorescens*). Dünnschnitt; Elektronenmikroskop; Aufnahmevergr. 24000:1; Endvergr. 66000:1

In den folgenden Ausführungen soll der derzeitige Stand der Erforschung von *Bdellovibrio bacteriovorus* in großen Zügen umrissen werden.

#### Isolierungstechnik und Vorkommen

Wegen seiner obligat parasitischen Natur kann *Bd.* nicht auf den in der Bakteriologie üblicherweise verwendeten Standard- oder Spezialnährböden isoliert werden. Die Parasiten erfordern lebende Wirtsbakterien als Substrat. Damit ergibt sich bei Isolierungsversuchen zwangsläufig eine Selektion von *Bd.*-Stämmen, die für den jeweils eingesetzten Wirt lytische Aktivität besitzen.

In Bodensuspensionen und Gewässern kann *Bd.* nach geeigneter Zentrifugation durch fraktionierte Filtration von größeren Organismen abgetrennt und in einem Gemisch mit anfälligen Wirtsbakterien durch Plaquebildung nachgewiesen werden. Die für Isolierung, Vermehrung und Titration (zur quantitativen Bestimmung) von Bakteriophagen entwickelte Doppelschichtmethode läßt sich in modifizierter Form auch bei *Bd.* anwenden [9, 13, 15]. Da die Parasiten in einem Nährsubstrat, das den Wirtsbakterien üppiges Wachstum erlaubt, durch die entstehenden Stoffwechselprodukte mehr oder weniger stark gehemmt werden können, ist es vorteilhaft, die Bakterien (als „Futter“ für die Parasiten) konzentriert einzupflanzen,



Fig. 6. *Bdellovibrio bacteriovorus* im Innern einer partiell lysierten Wirtszelle (*Pseudomonas fluorescens*). Dünnschnitt; Elektronenmikroskop; Aufnahmevergr. 30000:1; Endvergr. 52500:1

Namen beschrieben [13, 14]. Später erhielt das Raubbakterium den Namen *Bdellovibrio bacteriovorus*\* [15].

\* Nach einem Vorschlag von R. E. BUCHANAN (USA). Der Gattungsname „*Bdellovibrio*“ soll zum Ausdruck bringen, daß es sich um einen vibrioähnlichen Organismus handelt, der in seiner Verhaltensweise (Anheftung an den Wirt) an einen Blutegel erinnert („*Bdello*“ ist vom griechischen Wort für Blutegel abgeleitet). Mit der Spezies-Bezeichnung „*bacteriovorus*“ soll zum Ausdruck gebracht werden, daß sich der Parasit von Bakterien ernährt.

aber mit nur geringen Nährstoffmengen zu versorgen (z. B. 0,3% Hefeextrakt + 0,06% Pepton; pH 7,2).

Mit der Isolierungstechnik durch Filtration werden nicht alle in einem Bodenextrakt befindlichen Parasiten erfaßt, weil ein Teil bei der Filtration verloren geht. In Böden wurden für ein gegebenes Wirtsbakterium im allgemeinen nur 50 Parasiten/Gramm Boden nachgewiesen, in Abwässern erheblich mehr [8, 9, 15].

Mit einer Isolierungstechnik, die allein auf Zentrifugation beruht, wurden für verschiedene Enterobakterien und Pseudomonaden Konzentrationen von 500 bis 1000 Parasiten/ml Abwasser ermittelt [2]. Mit einer anderen Technik wurden in Abwasser sogar mehrere Tausend Zellen/ml bestimmt [6].

Für den qualitativen Nachweis und die Isolierung neuer Stämme von *Bd.* hat sich eine sehr einfache *Anreicherungs-methode* bewährt, die im Prinzip darauf beruht, daß eine konzentrierte Suspension lebender Bakterien (ca.  $10^{10}$  Zellen/ml; 24 h alt) mit einer geringen Menge des zu untersuchenden Natursubstrates in sehr verdünnter Nährlösung (0,03 % Hefeextrakt) beimpft wird. Das Gemisch wird bei 28 °C für 2 Tage geschüttelt. Die hohe Zellkonzentration und der geringe Nährstoffgehalt lassen keine Vermehrung der Wirtsbakterien zu. Das „lebende Substrat“ erlaubt aber eine selektive Anreicherung von *Bd.*-Zellen, die dann mikroskopisch oder kulturell in einfacher Weise nachgewiesen werden können. Vielfach ist die Anwesenheit von Parasiten schon makroskopisch an dem durch die Lysis bedingten Rückgang der optischen Dichte zu erkennen.

Ökologische Untersuchungen haben gezeigt, daß *Bd.* in Böden und Gewässern *weltweit verbreitet* ist und als integraler Bestandteil der natürlichen Mikroflora betrachtet werden muß. Bisher wurden die Parasiten in Böden aus verschiedenen europäischen Ländern, aus Californien, Mittel- und Südamerika, Japan, Ceylon, Australien, Afrika [10, 13, 15] sowie in Indien [2] und Israel [6] nachgewiesen. Aus Meerwasser konnten obligat halophile Vertreter isoliert werden [6].

Die Aktivität von *Bd.* ist auf Gram-negative Bakterien beschränkt. Pseudomonaden und Enterobakterien scheinen besonders anfällige Wirte zu sein. „Harmlose“ und pathogene Bakterien werden in gleicher Weise lysiert. Unter anderen haben sich die folgenden Bakterien als anfällig erwiesen: Phytopathogene *Pseudomonas*- und *Xanthomonas*-Bakterien, *P. aeruginosa* sowie Vertreter der Gattungen *Salmonella*, *Aerobacter*, *Proteus*, *Serratia*, *Escherichia* und *Erwinia*.

Die verschiedenen Isolierungen von *Bd.* zeigen gewisse Unterschiede in dem Wirtsspektrum ihrer lytischen Aktivität. Einige sind relativ spezifisch und greifen nur bestimmte Stämme einer Art oder bestimmte Arten einer Gattung an, andere besitzen eine Aktivität, die etwa alle Bakterien einer Gattung erfaßt. Die Mehrzahl der Isolierungen ist durch ein relativ breites Wirtsspektrum ausgezeichnet. Da es experimentell möglich ist, aus einer Population des Parasiten Individuen mit veränderter Wirtsaktivität zu selektieren, und weil die Frage der Stabilität dieses Merkmals noch nicht genügend untersucht worden ist, wird es einstweilen für wenig sinnvoll gehalten, die in ihrer Wirtsaktivität sich unterscheidenden Stämme taxonomisch als verschiedene „Spezies“ zu differenzieren.

#### *Manifestation der lytischen Wirkung*

Wie erwähnt, werden von *Bd.* lytische Reaktionen verursacht, die in ihrem äußeren Erscheinungsbild den von Bakteriophagen hervorgerufenen lytischen Erscheinungen ähnlich sind. In einem Bakterienrasen entstehen in Abhängigkeit von der Konzentration der

Parasiten einzelne Plaques oder konfluierende Lysiszonen. Die Größe der Plaques nimmt über mehrere Tage zu, weil sich die Parasiten — im Gegensatz zu Phagen — auch auf Bakterien aus der stationären Entwicklungsphase vermehren. Obwohl die Entwicklung von *Bd.* keine stoffwechselaktiven Wirtsbakterien der logarithmischen Entwicklungsphase erfordert, sind alte Wirtszellen (z.B. in einem 8 Tage alten Bakterienrasen), auch wenn sie noch entwicklungsfähig sind, für *Bd.* ungeeignete Objekte. Die Plaques in einem Bakterienrasen repräsentieren Kolonien der Parasiten.

In einer Suspension von infizierten Wirtsbakterien wird durch die lytische Aktivität der Parasiten eine Aufhellung der Kultur verursacht. Unter optimalen Bedingungen (geringe Nährstoffkonzentration der Lösung; stoffwechselphysiologisch aktiver Zustand der Parasiten und Wirtsbakterien) kann in Flüssigkeitskultur schon nach einigen Stunden komplette Lysis eintreten, vorausgesetzt, daß die Parasiten in hoher Zahl eingeimpft werden (in Äquivalenz mit den Wirtsbakterien oder konzentrierter).

Sowohl in Plaques oder konfluierenden Lysiszonen auf festem Substrat als auch in Flüssigkeitskultur sind *Resistenzerscheinungen*, wie sie von Bakteriophagen, Antibiotica und anderen biologischen Agentien bekannt sind, bisher nicht beobachtet worden.

#### *Verhalten und Beziehung zur Wirtszelle*

Einzelzellen des Parasiten haben an ihrer dicksten Stelle einen Durchmesser von etwa  $0,3 \mu$  und sind  $1 \mu$  lang. Bei verschiedenen Herkünften bestehen geringfügige Unterschiede in Größe und Gestalt. Die auffallend kräftige Geißel hat die mehrfache Länge des Zellkörpers und ist mehr als doppelt so dick wie die Geißel einer *Pseudomonas*-Zelle (Fig. 4). Nach neueren Untersuchungen ist die Geißel  $28 \mu$  dick. Sie besteht aus einem inneren Strang von  $13 \mu$  Durchmesser und einer diesen Strang umgebenden Scheide von  $7,5 \mu$  Dicke [5]. Während die Relation von Geißeldicke zu Zelldicke bei vielen Bakterien in der Größenordnung von 1:60 bis 1:100 liegt, ist das Verhältnis bei *Bd.* etwa 1:10. Das dürfte die extrem hohe Motilität des Parasiten erklären. Die Auswertung von Filmaufnahmen (hohe Aufnahme-frequenz) hat ergeben, daß *Bd.* eine relative Geschwindigkeit von 100 Körperlängen pro Sec. erreicht [11].

Da es bislang nicht gelungen ist, *Bd.* in der Form des parasitischen Wildtyps auf einem bakterienfreien Substrat bekannter Zusammensetzung zu kultivieren, ist das Studium der Stoffwechselphysiologie (Ernährungsansprüche, Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren, Verwertbarkeit von C- und N-Quellen, etc.) erschwert oder unmöglich. Aus diesem Grunde ist über die Physiologie von *Bd.* erst wenig bekannt. Alle untersuchten Stämme sind aerob, besitzen Cytochrom C-Oxydase und sind Katalase-negativ. Bei reduziertem Sauerstoff-Partialdruck sind sie noch lytisch aktiv, werden unter strikt anaeroben Bedingungen (in Gegenwart von anfälligen, fakultativ-anaeroben Bakterien) aber inhibiert [12, 15]. Der Wildtyp von *Bd.* ist Streptomycin-empfindlich. Wie andere Bakterien läßt sich auch *Bd.* durch Lyophilisation konservieren.

Im Gegensatz zu *Bd.* sind die Vertreter der Gattung *Vibrio* (mit 2 Ausnahmen, die inzwischen in die Gattung *Campylobacter* gestellt wurden) Katalase-positiv und metabolisieren Kohlehydrate. Untersuchungen über die Zusammensetzung der Nucleinsäuren haben die Sonderstellung von *Bd.* bestätigt. Für *Vibrio* sind 47% GC (Verhältnis von Guanin + Cytosin zum Gesamt-Basengehalt) charakteristisch [4]. Für *Bd.* wurden 43% GC ermittelt [1]. *Campylobacter fetus* und *C. bubulus*, für die am ehesten eine verwandtschaftliche Beziehung zu *Bd.* hätte vermutet werden können, haben 34% bzw. 30% GC [1, 4]. Da die Basenzusammensetzung der DNS ein wertvolles taxonomisches Merkmal darstellt, erscheint die Schaffung der Gattung *Bdellovibrio* auch aus dieser Sicht gerechtfertigt.

*Bd.* greift anfällige Bakterien mit dem der Geißel gegenüberliegenden Zellende an. Dabei kommt es zu einer heftigen Kollision. Der Angriff scheint gerichtet zu sein. Unmittelbar nach dem Zusammenstoß ist in der Regel ein schnelles Rotieren des Parasiten (um seine Längsachse) zu beobachten. Die Auswertung von Zeitlupenaufnahmen hat auch zu dieser Frage einige objektive Daten geliefert: *Der Parasit rotiert* bis zu annähernd 100mal in der Sekunde [11]. Durch den ballistischen „Einschlag“ in die Zellwand des Wirtes und durch die Rotation (Bohreffekt?), die sich in Abständen wiederholt, wird möglicherweise rein mechanisch ein Loch *in die Zellwand* „gebohrt“, durch das der Parasit in das Zellinnere eindringt. Es wird vermutet, daß die am Anheftungspol festgestellten Filamente von 0,8  $\mu$  Länge und 45 bis 55 Å Dicke an der mechanischen Schädigung der Zellwand beteiligt sind [6]. Da es bislang nicht gelungen ist, in einem Lysat von Wirtsbakterien oder in einer Lösung aus mechanisch zertrümmerten Parasitenzellen Enzyme nachzuweisen, von denen lebende und intakte Bakterien geschädigt werden [12, 15], dürfte die „ballistische“ Theorie nicht ganz abwegig sein.

Nicht anfällige Bakterien werden von den Parasiten ignoriert. Bewegliche Bakterien stellen ihre Motilität meist schon wenige Sekunden nach Befall ein. Bei *Rhodospirillum rubrum* wurde beobachtet, daß die Bewegung etwa 5 sec nach Befall sistierte. Große Bakterien, wie *Spirillum serpens*, „vertragen mehr“ und können mit angehefteten Parasiten noch für einige Minuten bewegungsfähig sein [8, 12].

Beim Eindringen in das Wirtsbakterium muß sich der Parasit durch ein relativ kleines Loch in das Innere der Zelle zwängen. In elektronenmikroskopischen Schnittbildern sind gelegentlich Konstrictionen am Parasiten zu erkennen (Andeutung in Fig. 5). Für das Eindringen, das mehrere Minuten in Anspruch nimmt (vgl. Fig. 1), ist vermutlich die Geißelbewegung die treibende Kraft. Wie in Fig. 5 zu erkennen ist, wird die cytoplasmatische Membran nicht durchstoßen, sondern hebt sich von der Zellwand ab und weicht zurück. Nach der Anheftung und Durchbohrung der Zellwand beginnt die Lysis des Cytoplasmas. Im Bereich des Zellwandloches bildet sich ein Zwischenraum aus, in den der Parasit hineinschlüpft. Mit fortschreitender Lysis nimmt die Disorganisation des Cytoplasmas zu. Gleichzeitig vergrößert sich die Vakuole und verkleinert sich der von der cytoplasmatischen Membran umgebene Zellinhalt. Der im Innern befindliche Parasit nimmt gewöhnlich stark an Größe

zu, bevor er sich teilt [17]. Vielfach bilden sich spirillenförmige Gebilde aus, die später in Einzelzellen zerfallen [3]. Die Neigung zur Kettenbildung im Zellinnern ist bei verschiedenen *Bd.*-Stämmen unterschiedlich. Wenn der gesamte Zellinhalt verdaut ist und sich die Parasiten im Innern vermehrt haben, kommt es schließlich zur Freisetzung der Parasiten (Fig. 3 b). Gelegentlich sieht man im Phasenkontrast „Sphäroplasten“, in denen sich die Parasiten aktiv bewegen. Erst wenn die osmotisch sensitiven Gebilde kollabieren, werden die Parasiten frei [11]. Aus dem Zerplatzen der ballonartigen Kugeln kann geschlossen werden, daß sich ursprünglich vorhandene Löcher in der Zellwand wieder geschlossen haben.

*Der lytische Prozeß* ist in seinem biochemischen Verlauf noch weitgehend unbekannt. Im Prinzip erfordert die durch *Bd.* verursachte Lysis die gleichen zellulären Veränderungen, wie sie bei autolytischen oder induzierten lytischen Prozessen auftreten [16]. Die nach Befall mit *Bd.* eintretende Abrundung der Zelle zu einem Sphäroplast-ähnlichen Gebilde ist zwangsläufig mit dem Abbau der rigiden Zellwandstrukturen (Mureinsacculus) verbunden, die für Form und Festigkeit der Zelle verantwortlich sind. Es ist bislang nicht bekannt, ob *Bd.* nach der Anheftung mureinolytische Enzyme freisetzt. Möglicherweise werden durch die mechanische Einwirkung Kontrollmechanismen in der Wirtszelle gestört, die das Gleichgewicht in Richtung Mureinabbau verschieben. Für die Beteiligung wirtseigener Aktivitäten spricht die Tatsache, daß physiologisch junge und stoffwechselaktive Zellen auf *Bd.*-Befall schneller mit Sphäroplastierung reagieren als alte Zellen. Die Bildung eines Sphäroplasten ist oftmals schon abgeschlossen, bevor der Parasit eingedrungen ist [11]. Mit zunehmender Lysis des Zellinhalts und damit verbundenem Anstieg des osmotischen Drucks nimmt der Sphäroplast an Größe zu (Fig. 2 b, c).

Die von *Bd.* gebildeten proteolytischen *Exoenzyme* haben auf lebende und zellwandintakte Bakterien keine Wirkung. Sie lysieren nur tote oder durch chemische Behandlung oberflächengeschädigte Zellen [7, 15]. Auch durch *Bd.*-Angriffe geschädigte Bakterien werden (nach Trennung oder Abtötung der Parasiten) durch die Proteasen lysiert [6]. Offensichtlich bekommen die proteolytischen Fermente durch die lokalen Zellwandschäden Zugang zum Cytoplasma.

Nach den bisher bekannt gewordenen Tatsachen ist die Bakteriolyse durch *Bd.* ein in *zwei Schritten* ablaufender Prozeß. Der erste Schritt wird mit dem Angriff und der Anheftung des Parasiten eingeleitet. An der Anheftungsstelle entsteht ein Loch in der Zellwand, durch das der Parasit in das Zellinnere gelangt. Als zweiter Schritt folgt die enzymatische Verdauung der Zellbestandteile. Ob die primäre Zellwandschädigung allein durch mechanische Einwirkung verursacht wird oder zusätzlich enzymatische Leistungen des Parasiten erfordert, ist noch unbekannt. Die Vorstellung, daß sich der Parasit mit einem „Infektionspolster“ anheftet und die Zellwand durch enzymatische Aktivität lokal auflöst [3] ist experimentell nicht bewiesen. Daß Parasit und Wirt im primären Befallsstadium keine „feste Bindung“ im Sinne einer Verschmelzung von Strukturen beider Organismen eingehen, beweist die Tatsache, daß die Parasiten

nach Anheftung und Rotation die Wirtszelle verlassen können, um sich ein anderes Opfer zu suchen.

### Saprophytische Mutanten

Aus einer Population des parasitischen Wildtyps können Mutanten selektiert werden, die sich auf einem bakterienfreien Nährboden (1% Pepton + 0,3% Hefeextrakt; pH 7,2) saprophytisch entwickeln. Die Mutationsrate liegt in der für Bakterien üblichen Größenordnung [13, 15]. Die saprophytischen Mutanten haben die Fähigkeit verloren, lebende Bakterien anzugreifen und zu lysieren.

Die Gestalt der saprophytischen Abkömmlinge ist variabel (vibrio-, spirillen-, stäbchen- oder kugelförmig). Während Vertreter des parentalen Wildtyps einheitlich 1 Geißel besitzen, variiert die Begeißelung der Saprophyten hinsichtlich Zahl (1 bis 3) und Art der Insertion (mono- und bipolar).

Da sich die saprophytischen Mutanten wie „gewöhnliche“ Bakterien kultivieren lassen, können ihre physiologischen Eigenschaften und biochemischen Aktivitäten mit den in der Bakteriologie üblichen Methoden untersucht werden. Die bisher geprüften Stämme lassen sich wie folgt charakterisieren:

1. Aerob und Katalase-negativ (wie die parasitischen Eltern).
2. Proteolytisch aktiv oder inaktiv (je nach Stamm).
3. Kein oxydativer oder fermentativer Abbau von Kohlehydraten, Alkoholen oder organischen Säuren.
4. Positiv in Dehydrogenase und Cytochrom C-Oxydase.
5. Bilden einen gelben Farbstoff [15] oder sind pigmentfrei (je nach Stamm).
6. Schlechtes Wachstum auf festem Nähragar (1,6%); üppige Entwicklung in Flüssigkeit oder halbfestem Agarmedium (0,8%).

Aus einer Population saprophytischer Zellen können Rückmutanten zum parasitischen Wildtyp selektiert werden (durch Mischung einer konzentrierten Saprophyten-Lösung mit Wirtsbakterien, die von dem parentalen Typ lysiert werden). Bei proteolytisch inaktiven Abkömmlingen ist es bisher nicht gelungen, parasitische Rückmutanten zu selektieren [8].

Aufgrund ihrer Eigenschaften können die saprophytischen „Laborstämme“ — ebensowenig wie die Parasiten — einer schon bekannten Kategorie von Bakterien zugeordnet werden. Taxonomisch sind die Stämme als avirulente „*Bdellovibrios*“ zu betrachten.

Die Mehrzahl der Saprophyten wächst gut in Flüssigkeitskultur oder bei massiver Einsaat in einen halbfesten Agarnährboden, die Ausbildung von Einzelkolonien (in Verdünnungsreihe) ist jedoch gehemmt. Durch Zusatz von Kulturfiltrat (0,1% aus einer Flüssigkeitskultur desselben Stammes) wird die Fähigkeit der Einzelzellen, sich zu Kolonien zu entwickeln, stark gefördert. Der Wachstumsfaktor ist hitzestabil, seine chemische Natur ist unbekannt. Ein entwicklungsfördernder Einfluß auf parasitische Zellen in bakterienfreiem Substrat wurde nicht festgestellt [12].

Es ist naheliegend, daß Versuche unternommen wurden, *Bd.* in der parasitischen Wildform auf einem bakterienfreien Substrat zu kultivieren. Aus eigenen Untersuchungen wurde geschlossen, daß die parasitische Form auf irgendwelchen komplexen Nährböden

(ohne lebende Bakterien) nicht kultivierbar ist [8, 13, 15]. Durch Hitze, Chloroform, Toluol oder andere Agentien abgetötete Wirtsbakterien waren ebensowenig ein geeigneter Ersatz für lebende Zellen wie Bakterienextrakte, Ultraschallpräparationen oder durch Phagenwirkung gewonnene Lysate. Lediglich durch Streptomycin blockierte oder durch UV-Behandlung inaktivierte Bakterienzellen konnten lysiert werden und waren für eine Vermehrung der Parasiten geeignet [8]. Von anderer Seite wird berichtet, daß es gelungen sei, *Bd.* in wirtsunabhängiger Kultur zu vermehren [1, 6, 7]. Die Ergebnisse beziehen sich auf einen bestimmten Stamm (*Bd.* A 3.12); Versuche mit anderen *Bd.*-Stämmen waren gleichfalls negativ verlaufen [1, 7]. In eigenen Untersuchungen mit *Bd.* A 3.12 war es nicht möglich, den Wildtyp oder daraus selektierte Mutanten in der parasitischen Form auf totem Substrat zu kultivieren. Bei den aus *Bd.* A 3.12 abgeleiteten wirtsfreien Kulturen handelte es sich ausnahmslos um Mischpopulationen. Die Analyse von Einzelzellen und ihrer klonalen Nachkommenschaft spricht gegen die Auffassung, daß es Individuen gibt, die sowohl zur Plaquebildung (als Parasiten) als auch zur Koloniebildung (als Saprophyten) befähigt sind\*.

### Schlußbetrachtung

Das ubiquitäre Vorkommen von *Bdellovibrio bacteriovorus* legt die Vermutung nahe, daß dieser mit besonderen Fähigkeiten ausgestattete Organismus im mikrobiologischen Geschehen am natürlichen Standort eine wichtige Rolle spielt. Die wenigen ökologischen Untersuchungen, die sich vornehmlich auf den Nachweis der Existenz des Bakterienparasiten an diesem oder jenem Standort konzentriert haben, erlauben vorläufig keine Aussage über die tatsächliche ökologische Bedeutung. Für das Studium der Dynamik von natürlichen Bakterienpopulationen dürften die von *Bd.* verursachten Wirkungen aber von erheblichem Interesse sein.

Es ist naheliegend, daß ein bisher unbekanntes bakteriolytisches Phänomen auch die Frage nach seiner praktischen Nutzbarmachung bei der Bekämpfung von Krankheitserregern oder anderen unerwünschten Bakterien aufwirft. Ob sich für einen direkten Einsatz der Parasiten im Sinne einer „biologischen Kontrolle“ oder für eine *therapeutische Ausnutzung* des lytischen Prinzips Möglichkeiten ergeben werden, ist heute noch nicht zu übersehen.

Für den Mikrobiologen ist der Bakterienparasit ein faszinierendes Objekt. Seine Existenz hat viele interessante Fragen aufgeworfen. Bislang wissen wir nur wenig über *Bdellovibrio* und seine Beziehung zur Wirtszelle. Die Ernährungsphysiologie des Parasiten, die Grundlage der Spezifität, der Mechanismus der Anheftung und primären Zellwandschädigung, die chemischen Vorgänge bei der Lysis und viele andere Teilfragen sind noch weitgehend ungeklärt und bedürfen intensiver experimenteller Bearbeitung.

Die Herstellung der Ultra-Dünnschnitte und die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen verdanke ich Herrn Dr. H. PETZOLD, Biologische Bundesanstalt, Berlin-Dahlem. Die zitierten Filme [11] wurden mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft hergestellt.

\* Die experimentellen Daten zu dieser Frage werden an andere Stelle veröffentlicht.

[1] BRUFF, B.: M. S. THESIS, University of California, Berkeley (1964). — [2] DIAS, F. F., u. J. V. BHAT: Appl. Microbiol. 13, 257 (1965). — [3] SCHERFF, R. H., J. E. DE VAY u. TH. W. CARROLL: Phytopathol. 56, 627 (1966). — [4] SEBALD, M., u. M. VÉRON: Ann. Inst. Pasteur 105, 897 (1963). — [5] SEIDLER, R. J., u. M. P. STARR: Bacteriol. Proc. 1967, 41. — [6] SHILO, M.: Science J. 2, 33 (1966). — [7] SHILO, M., u. B. BRUFF: J. Gen. Microbiol. 40, 317 (1965). — [8] STOLP, H.: Lectures on Theoretical and Applied Aspects of Modern Microbiology, p. 19. University of Maryland 1963/64. — [9] STOLP, H.: Zbl. Bakt. I, Supplementheft 1, 52 (1965). — [10] STOLP, H.: Umschau Wiss. Techn. 67, 58

(1967). — [11] STOLP, H.: Filme C 972 u. E 1314, in Zusammenarbeit mit dem Institut für den Wissenschaftl. Film, Göttingen (1967). — [12] STOLP, H.: unveröff. — [13] STOLP, H., u. H. PETZOLD: Phytopath. Z. 45, 364 (1962). — [14] STOLP, H., u. M. P. STARR: Bacteriol. Proc. 1963, 47. — [15] STOLP, H., u. M. P. STARR: J. Microbiol. and Serol. 29, 217 (1963). — [16] STOLP, H., u. M. P. STARR: Ann. Rev. Microbiol. 19, 79 (1965). — [17] STARR, M. P., u. N. L. BAIGENT: J. Bacteriol. 91, 2006 (1966).

Eingegangen am 3. November 1967

## Darstellung von Chromosomen im Raster-Elektronenmikroskop nach Enzymbehandlung

I. H. PAWLOWITZKI, R. BLASCHKE und R. CHRISTENHUSZ

Institut für Humangenetik und Institut für Medizinische Physik der Universität Münster

Die Ultrastruktur von Chromosomen ist weitgehend unbekannt; keines der vorgeschlagenen Modelle über den räumlichen Aufbau der Kernkörper genießt allgemein Anerkennung. Zur Erforschung der Chromo-

Das Gerät unterscheidet sich vom herkömmlichen Durchstrahlungs-Elektronenmikroskop dadurch, daß nicht die Innenstruktur sondern das Oberflächenrelief eines Objektes abgebildet wird.

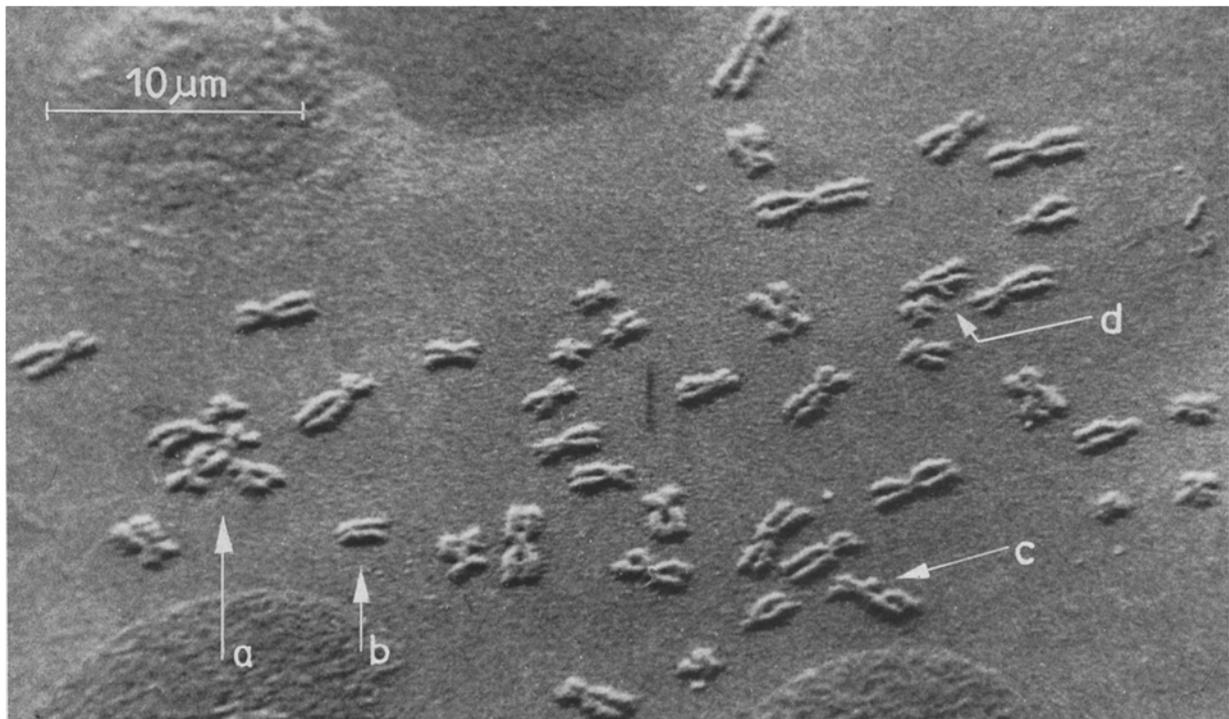


Fig. 1. Chromosomen eines Patienten mit Trisomie 21—22 (Mongolismus). *a* Chromosomengruppe mit Satellitenassoziation, *b* Y-Chromosom, *c* Chromatidenbruch eines Chromosoms  $B_{1-5}$ , *d* partieller Chromatidenbruch eines Chromosoms  $D_{13-15}$ . (Bin Chromosom aus der C-Gruppe liegt außerhalb des Blickfeldes.) Proteolyse: 250  $\gamma$  Trypsin 1:300/ml Pufferlösung, 15 min, Objektneigungswinkel: 55°, Vergr. ca. 3400:1

somenstruktur dienten bisher das Licht- und das Transmissions-Elektronenmikroskop, ergänzt durch Autoradiographie, histochemische und enzymatische Methoden.

Das Raster-Elektronenmikroskop ermöglicht jetzt ein neues Verfahren, Chromosomen darzustellen\*.

\* Wir arbeiten mit dem Raster-Elektronenmikroskop „Stereoscan“ der Fa. Cambridge Instruments Co. Ltd., Cambridge

Um Chromosomen im Raster-Elektronenmikroskop darzustellen, muß daher das Zelleiweiß beseitigt werden, das die Chromosomen meist vollständig umhüllt; andernfalls können nur diejenigen Kernkörper abgebildet werden, die zufällig aus der Plasmadecke herausragen [1, 2], gezielte Chromosomenuntersuchungen wären unmöglich. Ferner muß die Oberfläche des Chromosomenpräparats elektrisch leitend sein, um