

Cytologische Untersuchungen an *Chromatium okenii* Perty

VON G. KRAN, F. W. SCHLOTE und H. G. SCHLEGEL, Göttingen

Die bisher nach elektronenmikroskopischen Methoden auf ihre Feinstruktur hin untersuchten phototrophen Bakterien, die schwefelfreien und schwefelhaltigen Purpurbakterien ([1] bis [8]), unterscheiden sich ihrer Größe nach von der Masse der Bakterien nicht wesentlich. Das erst unlängst in Anreicherungskultur genommene [9] und in einer vollsynthetischen Nährlösung [10] gut wachsende Schwefelpurpurbakterium *Chromatium okenii* hebt sich durch seine Abmessungen (5 bis 6×8 bis 15μ) von verwandten Arten ab. Im Zusammenhang mit Untersuchungen über die Speicherstoffsynthese C-autotropher Bakterien [11] ist Poly- β -hydroxybuttersäure auch in *Chromatium okenii* aufgefunden worden [12]. Es ließen sich die Bedingungen ermitteln, unter denen lediglich einer der in Vakuolen oder in Form von Granula intracellulär abgelagerten Reservestoffe, Schwefel, Poly- β -hydroxybuttersäure oder Polysaccharid, angehäuft wurde (G. KRAN unveröff.). Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Ultradünnschnitten solcher Zellen, die nahezu ausschließlich einen einzigen Speicherstoff angehäuft hatten, mußte die Zuordnung einzelner Vakuolentypen und Innenstrukturen zu den entsprechenden Reservestoffen zweifelsfrei möglich sein.

Physiologische Bedingungen

Werden die Zellen in einem Mineralmedium an einem Nordfenster im normalen tagesperiodischen Beleuchtungsrhythmus herangezogen, so ist ihr Polysaccharidgehalt gering (etwa 5% vom Trockengewicht), Poly- β -hydroxybuttersäure ist nicht nachweisbar, und der Schwefelgehalt hängt vom Vorhandensein von Schwefelwasserstoff in der Nährlösung ab. Nach Verbrauch des Schwefelwasserstoffs wird der intracelluläre Schwefel zu Sulfat oxydiert. Durch eine anschließende zweitägige Dunkellagerung der Kulturen lassen sich völlig schwefelfreie Zellen herstellen. Anscheinend werden wie bei *Chromatium D* [13] im Dunkeln im Zuge einer endogenen Fermentation Speicherstoffe abgebaut, und angehäufte Schwefel wird zu H_2S reduziert. Nach anhaltender Dunkellagerung waren auch Polysaccharide nicht mehr nachweisbar.

Wurden solche speicherstoffarme Zellen einige Stunden in Gegenwart von H_2S im Licht inkubiert, so füllten sie sich rasch mit Schwefelkugeln an, ohne daß eine nennenswerte Synthese anderer Speicherstoffe erfolgte.

Werden die Zellen in einer N-freien Nährlösung, also in Abwesenheit einer Stickstoffquelle, mit oder ohne Kohlendioxid in Gegenwart einiger organischer Substrate und von H_2S im Licht inkubiert, so häufen sie Polysaccharid an. Im Säurehydrolysat solcher Zellen waren 20% (mit Propionsäure oder Äpfelsäure inkubiert) und 30% (mit Bernsteinsäure inkubiert) des Trockengewichts an reduzierendem Zucker enthalten.

Poly- β -hydroxybuttersäure wird in Abwesenheit einer N-Quelle angehäuft, wenn den Zellen Essigsäure zur Verfügung steht. Diese Säure, die auch das Wachstum in einer normalen Nährlösung fördert, wird unter Speicherbedingungen vorwiegend zur Synthese von Poly- β -hydroxybuttersäure verwertet. In einer CO_2 -freien Nährlösung wurde PHBS bis zu 20% des Trockengewichts angehäuft. Das Polymere ist in diesen Zellen schon lichtmikroskopisch gut sichtbar und durch Färbung mit Sudan schwarz B als Lipid nachweisbar. Werden die PHBS-reichen Zellen wieder in normale Nährlösung gebracht, so verschwindet der Speicherstoff im Laufe mehrerer Zellteilungen wieder.

Veränderungen der Struktur der die Pigmente enthaltenden Chromatophoren wurden durch Streptomycin-zusatz zu erzielen versucht. Streptomycin verursacht bei Grünalgen und Pflanzen apochlorotische und apoplastische Effekte [14], [15]. Auf *Chromatium okenii* wirkt es in einer Konzentration von $100 \mu g/ml$ Nährlösung toxisch und sistiert das Wachstum. Bei geringeren Konzentrationen ($1,0$ bis $0,1 \mu g/ml$) wird das Wachstum kaum beeinträchtigt.

Struktur

Zellen von *Chromatium okenii* wurden abzentrifugiert, mit Formol, Permanganat oder Osmiumtetroxyd fixiert, mit 2% Agar aufgenommen und über Aceton in Vestopal W eingebettet. Zur Nachkontrastierung dienten Bleihydroxyd [16] oder Uranylacetat [17]. Die wesentlichsten Befunde sind in den Fig. 1 bis 10 dargestellt und im Schema Fig. 11 zusammengefaßt worden.

Die Zellwand (Fig. 1, b bis d; Schema Fig. 11, a), die sich an die mehrschichtige Cytoplasmamembran (Fig. 1, a) nach außen zu anschließt, läßt sich durch Fixation mit Osmiumtetroxyd besonders gut darstellen. Sie besteht aus einer dunklen breiten Innenschicht (b), einer aus zwei dunklen und einer dazwischenliegenden helleren Zone zusammengesetzten wellenförmigen Mittelschicht (c) und einer faserigen dunklen Außenschicht (d). Durch $KMnO_4$ (Fig. 2) werden lediglich die Cytoplasmamembran und ein Teil der die Zellwand aufbauenden Schichten fixiert.

Weite Bereiche des Cytoplasmas werden von kleinen Bläschen eingenommen, die von einer mehrschichtigen Membran umhüllt sind, wie an $KMnO_4$ -fixierten Präparaten zu erkennen ist (Fig. 2; Schema Fig. 11, b). Ihr Lumen ist praktisch optisch leer. Diese Bläschen oder „Chromatophoren“ entstehen anscheinend durch Einstülpung der mehrschichtigen Zellgrenzmembran in das Cytoplasma (Fig. 2). Eine solche Bildungsweise legten bereits Untersuchungen an *Rhodospirillum rubrum* nahe [7]. Daß es sich bei diesen Bläschen um Strukturen des inneren Membransystems der Bakterienzelle handelt, die sich erst bei der Zerstörung der Zelle zu den bekannten Chromatophoren abrunden [8], ist wenig wahrscheinlich. In Zellen aus alten Kulturen scheinen die Membranen der Chromatophoren zu großen, unregelmäßig geformten Blasen zusammenzuzufießen.

Schwefel wird in großen, nach $KMnO_4$ -Fixierung von einer dicken elektronendichten Schicht begrenzten Vakuolen (Fig. 3, S; Schema Fig. 11, c) abgelagert. Nur durch Formolfixation und unmittelbar folgende Behandlung mit wäßriger Uranylacetatlösung gelang es bisher, auch den Inhalt der Schwefelvakuolen selbst sichtbar zu machen (Fig. 4, S). Vermutlich wird der Schwefel durch die sonst zur Fixierung verwendeten Oxydationsmittel $KMnO_4$ oder OsO_4 oxydiert und in eine wasserlösliche Form überführt.

Zellen, die mit Polysacchariden angereichert sind, enthalten relativ kleine, rundliche, von keinerlei Membran begrenzte Tropfen (Fig. 3, P; Schema Fig. 11, c). Ihr Inhalt läßt sich (Fig. 3) mit Bleihydroxyd nachkontrastieren.

Für die an Poly- β -hydroxybuttersäure reichen Zellen sind große, unregelmäßig geformte, zusammenfließende, ebenfalls von keinerlei Membran begrenzte Plasmabezirke typisch (Fig. 5; Schema Fig. 11, d). PHBS wie Polysaccharide werden demnach in der Grundsubstanz des Cytoplasmas als membranlose Tröpfchen abgelagert. Im Falle der PHBS fließen sie später zu größeren Inseln zusammen. Nur der Inhalt der Schwefelvakuolen ist durch eine deutliche Grenzschicht vom Grundcytoplasma getrennt.

Lichtmikroskopische Untersuchungen an Zellen, die mit HCl-Giemsa gefärbt worden waren, machten wahrscheinlich, daß das Zellkernmaterial, ausgenommen eine schmale Randzone, fast gleichmäßig über das Cytoplasma der Zellen verteilt ist. Dünnschnitt-Elektronenbilder von Zellen, die mit Osmiumtetroxyd fixiert worden waren, bestätigen diese Vermutung. An verschiedenen Stellen des Cytoplasmas findet man schmale Hellzonen mit den nach diesem Verfahren typischen kompakten, gelegentlich auffasernden Chromatinsträngen (Fig. 6, Pfeile; Schema Fig. 11, e). Nur in OsO_4 -fixierten Zellen stößt man außerdem in den das Kernmaterial beherbergenden Hellzonen sowie im Cytoplasma zwischen den Chromatophoren auf globuläre Ribosomen (Fig. 6). Das ist ver-

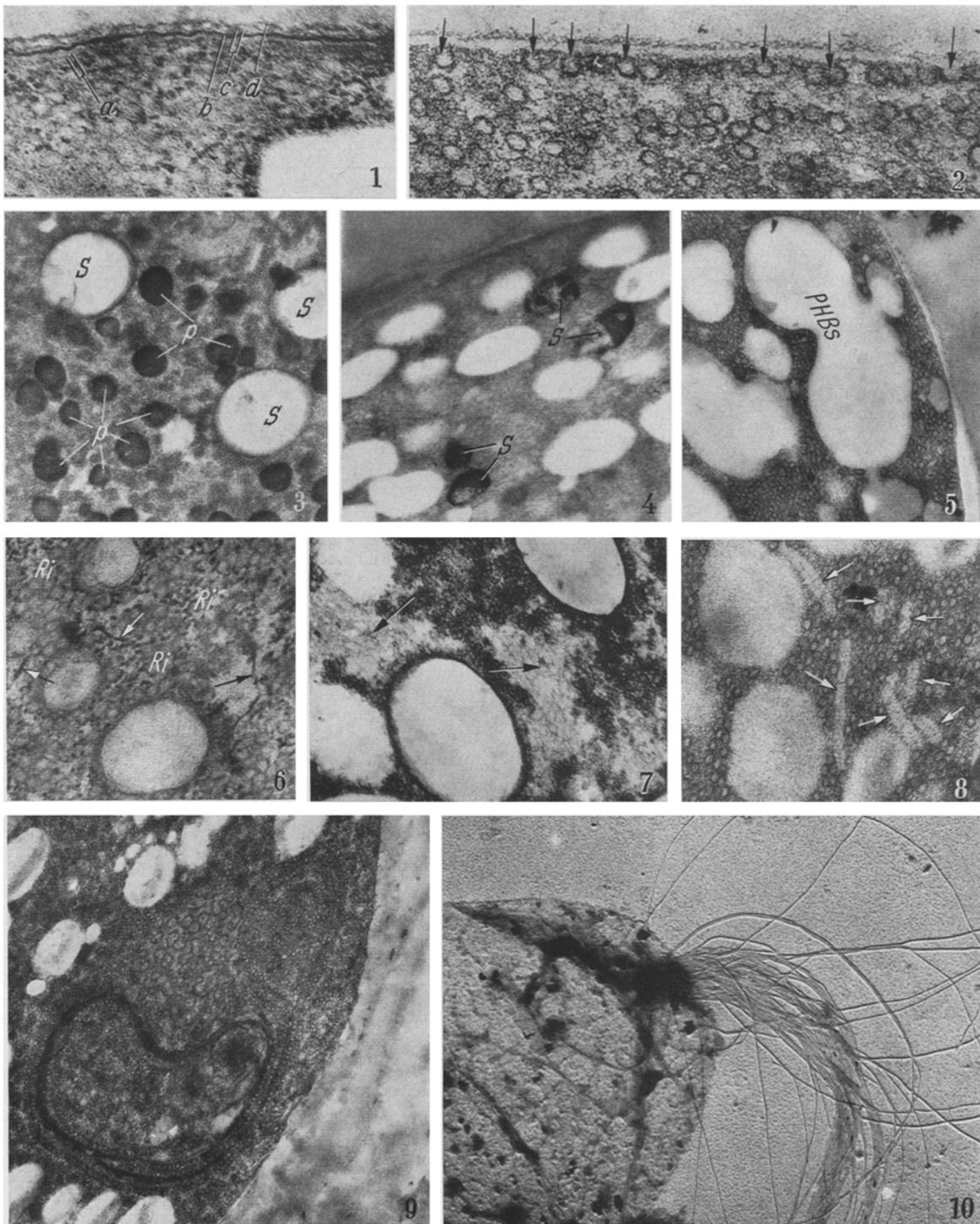


Fig. 1. *Chromatium okenii*, kultiviert unter Standardbedingungen, fixiert mit 1% OsO_4 , nachkontrastiert am Schnitt mit Uranylacetat. Das Cytoplasma wird durch eine aus zwei dunklen und einer hellen Schicht bestehende *Cytoplasmamembran* (a) umhüllt. In der nach außen anschließenden *Zellwand* erkennt man vier dunkle Zonen, die zum Teil mit helleren Zonen abwechseln: eine dicke innere Schicht (b), zwei wellenförmig verlaufende mittlere (c) und eine etwas faserige äußere Schicht (d), vgl. Zone a in Fig. 11. 100000 \times

Fig. 2. *Chromatium okenii*, fixiert mit 0,6% KMnO_4 , nachkontrastiert am Stück vor der Dehydratisierung mit Aceton mit wässriger Uranylacetatlösung. Von der Cytoplasmamembran falten sich *Chromatophoren* in das Cytoplasma hinein ab (Pfeile), vgl. Zone b in Fig. 11. 100000 \times

Fig. 3. *Chromatium okenii*, fixiert mit 0,6% KMnO_4 , nachkontrastiert am Schnitt mit Bleihydroxyd. Kleine *Polysaccharidvakuolen* (P), deren Inhalt mit Bleihydroxyd reagiert, zwischen großen optisch leeren *Schwefelvakuolen* (S), vgl. Zone c in Fig. 11. 20000 \times

Fig. 4. *Chromatium okenii*, fixiert mit Formol, nachkontrastiert am Stück mit wässriger Uranylacetatlösung. *Schwefelvakuolen* (Pfeile) mit dunklem granuliertem Inhalt. 30000 \times

Fig. 5. *Chromatium okenii*, Verfahren wie in Fig. 2. *Poly- β -hydroxybuttersäure* (PHBS) lagert sich in großen, offenbar zusammenfließenden Vakuolen ab, vgl. Zone d in Fig. 11. 30000 \times

Fig. 6. *Chromatium okenii*, Verfahren wie in Fig. 1. Die *chromosomalen Fäden* (Pfeile) sind von schmalen Hellzonen umgeben. In den Hellzonen und zwischen den Chromatophoren zahlreiche *Ribosomen* (Ri), vgl. Zone e in Fig. 11. 65000 \times

Fig. 7. *Chromatium okenii*, Verfahren wie in Fig. 2. Nach diesem Verfahren wird ein feinfädiges „*Nukleoplasma*“ (Pfeile) in unregelmäßig zerlappten Hellzonen sichtbar. 60000 \times

Fig. 8. *Chromatium okenii*, Verfahren wie in Fig. 2. Zwischen den Chromatophoren liegen *stäbchenförmige Gebilde* unbekannter Zusammensetzung (Pfeile), vgl. Zone f in Fig. 11. 60000 \times

Fig. 9. *Chromatium okenii*, Verfahren wie in Fig. 2. Unter *Streptomycineinfluß* ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) bilden sich in wachsenden Zellen *Myelinfiguren*. Hochauflösende Bilder zeigen einen typischen Lamellenbau, vgl. Zone g in Fig. 11. 22000 \times

Fig. 10. *Chromatium okenii*, lysierte Zelle mit *Geißelschopf* und dunklem Geißelansatz im Cytoplasma. 15000 \times

ständig, da Permanganat auch nach längerer Einwirkungszeit nukleinsäurehaltige Strukturen nicht fixiert. Fixiert man KMnO_4 -behandelte Zellen mit wäßriger Uranylacetatlösung am Stück nach, dann gelingt es, in Zellen mit relativ locker gepackten Chromatophoren große Hellzonen mit einem Geflecht aus dünnsten Fäden darzustellen. Es könnte sich dem Strukturtyp nach um „Nukleoplasma“ [18] handeln (Fig. 7).

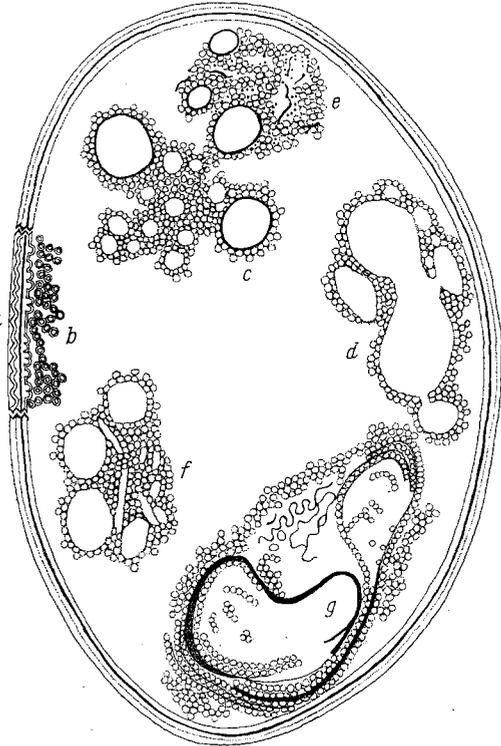


Fig. 11. Zusammengesetztes Schema einer Zelle von *Chromatium okenii*. a Die Zellwand ist mehrschichtig, vgl. Fig. 1. b Von der Cytoplasmamembran falten sich Chromatophoren ab, vgl. Fig. 2. c Zellen, die unter Standardbedingungen gewachsen sind, enthalten zwischen ihren Chromatophoren neben kleinen Polysaccharidvakuolen große von einer dunklen Schicht begrenzte Schwefelvakuolen, vgl. Fig. 3. d Poly- β -hydroxybuttersäure-Speicherung (PHBS) nach Fütterung mit Acetat, vgl. Fig. 5. e Hellzonen mit chromosomalen Fäden. Zwischen den Chromatophoren und in den Hellzonen zahlreiche Ribosomen, vgl. Fig. 6. f Zwischen den Chromatophoren liegen stäbchenförmige Gebilde unbekannter Zusammensetzung, vgl. Fig. 8. g Bildung von Myelinfiguren beim Wachstum unter Streptomycin, vgl. Fig. 9.

Unabhängig von Alter und Bedingungen, unter denen *Chromatium okenii* gewachsen ist, findet man im Cytoplasma zwischen den Chromatophoren langgestreckt stäbchenförmige Gebilde unbekannter Bedeutung (Fig. 8, Pfeile; Schema Fig. 11, f). Man erkennt einen zentralen dunklen Strang, der allseitig von lockerer Substanz ver-

hältnismäßig geringer Dichte umgeben wird. Soweit aus der Struktur erschlossen werden kann, bestehen keine Beziehungen zu den bisher beschriebenen Membranen und Lamellen des übrigen Cytoplasmas (vgl. [2], [19] und [4]).

Werden lebende Zellen von *Chromatium okenii* mit *Streptomycin* behandelt, so kommt es zu Veränderungen der Chromatophorenstruktur (Fig. 9; Schema Fig. 11, g). Es bilden sich einzelne Lamellen, dann Lamellenpakete, die sich am besten mit Myelinfiguren vergleichen lassen [20] bis [22]. Auch nach der Einwirkung von Diphenylamin, das bei *Chromatium okenii* zu einer Anreicherung von Carotinoidvorstufen führt [23] bilden sich ähnliche Strukturen.

Die Geißel von *Chromatium okenii* ist bereits im Lichtmikroskop gut sichtbar. Sie besteht aus einem Büschel von mehr als 40 einzelnen Strängen (Fig. 10). Diese entspringen einem dunklen rundlichen Körper, der, wie an lysierten Zellen zu erkennen ist, unter dem Pol der Zellen randnah im Cytoplasma liegt.

Die Feinstruktur von *Chromatium warmingii* und *Thiospirillum jenense* gleicht weitgehend der von *Chromatium okenii*.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung durch eine Sachbeihilfe.

Literatur

- [1] DREWS, G.: Arch. Mikrobiol. a) 23, 1 (1955); b) 36, 99 (1960); — c) Ber. dtsh. bot. Ges. 75, 338 (1962). — [2] VATTER, A. E., u. R. S. WOLFE: J. Bacteriol. 75, 480 (1958). — [3] VATTER, A. E., H. C. DOUGLAS u. R. S. WOLFE: J. Bacteriol. 77, 812 (1959). — [4] HICKMAN, D. D., u. A. W. FRENKEL: J. Biophys. Biochem. Cytol. 6, 277 (1959). — [5] FRENKEL, A. W., u. D. D. HICKMAN: J. Biophys. Biochem. Cytol. 6, 285 (1959). — [6] FULLER, R. C., u. D. B. MELLIN: Bacteriol. Proc. 1963, 45. — [7] GIESBRECHT, P., u. G. DREWS: Arch. Mikrobiol. 43, 152 (1962). — [8] COHEN-BAZIRE, G., u. R. KUNISAWA: J. Cell Biol. 16, 401 (1963). — [9] SCHLEGEL, H. G., u. N. PFENNIG: Arch. Mikrobiol. 38, 1 (1961). — [10] PFENNIG, N.: Naturwissenschaften 48, 136 (1961). — [11] SCHLEGEL, H. G., u. G. GOTTSCHALK: Angew. Chem. 74, 342 (1962). — [12] SCHLEGEL, H. G.: Arch. Mikrobiol. 42, 110 (1962). — [13] HENDLEY, D. D.: J. Bacteriol. 70, 625 (1955). — [14] PROVANSOLI, L., S. H. HUTNER u. A. SCHATZ: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 69, 279 (1948). — [15] ROSSNER, W.: Protoplasma 52, 580 (1960). — [16] WATSON, M. L.: J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 727 (1958). — [17] STRUGGER, S.: Naturwissenschaften 43, 357 (1956). — [18] RYTER, A., E. KELLENBERGER, A. BIRCH-ANDERSON u. O. MAALØE: Z. Naturforsch. 13b, 597 (1958). — [19] BOATMAN, E. S., u. H. C. DOUGLAS: J. Biophys. Biochem. Cytol. 11, 469 (1961). — [20] STOECKENIUS, W.: J. Biophys. Biochem. Cytol. 5, 491 (1959). — [21] CARBONELL, L. M., u. L. POLLAK: J. Bacteriol. 83, 1356 (1962). — [22] ROBERTSON, J. D.: J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 349 (1958). — [23] SCHMIDT, K., S. LIAAEN JENSEN u. H. G. SCHLEGEL: Arch. Mikrobiol. 46, 117 (1963).

Göttingen, Institut für Mikrobiologie und I. Zoologisches Institut der Universität

Eingegangen am 29. Juli 1963

Kurze Originalmitteilungen

Für die Kurzen Originalmitteilungen sind ausschließlich die Verfasser verantwortlich

Experimentelle Metasomatose an einem Granitkontakt

„Metasomatose ist eine Umbildung eines Gesteins, bei welcher dem Gestein Substanz zugeführt wird, wobei die Bindung oder Anreicherung der zugeführten Substanz durch bestimmte chemische Reaktionen stattfindet, an welchen sowohl ursprüngliche wie neugebildete Minerale teilnehmen“; das ist die 1922 von V. M. GOLDSCHMIDT¹⁾ gegebene Definition der Metasomatose. Es gibt eine Fülle verschiedener metasomatischer Prozesse; aber eine besonders wichtige Gruppe wird dadurch gekennzeichnet, daß die zugeführten Stoffe magmatischer Herkunft sind. Hierzu gehören auch die sog. Kontakt-skarne, die in Kalken und Dolomiten an und in der Nähe des Kontakts, vor allem zu Granitintrusionen gebildet worden

sind. Hier ist es offensichtlich, daß die dem ursprünglich karbonatischen Gestein zugeführten Substanzen vom Granit stammen. Da granitische Magmen einige Gew.-% an H_2O gelöst haben, welche zum überwiegenden Teil beim Kristallisieren freierwerden und in das Nebengestein dringen, kann dieses überkritische Wasser durch das, was es an Substanzen gelöst enthält, metasomatisch wirksam werden. Wie der Vorgang ist, wenn Dolomit am Kontakt eines Granits liegt, wurde unter 2000 Bar Gasdruck experimentell untersucht.

Ein Granit, bestehend aus jeweils 30% Quarz, Mikroklinperthit und Oligoklas und 10% Biotit, wurde gemahlen ($< 60 \mu \varnothing$) und zu einem Zylinder gepreßt; in gleicher Weise wurde mit einem recht reinen Dolomit verfahren. Die beiden