Zur Charakteristik einiger proteolytischer und nichtproteolytischer Bakterienarten des Genus *Pseudomonas*^{1, 2}

RAINER RUSCHKE

Limnologisches Institut der Universität Freiburg, Falkau/Schwarzwald

ABSTRACT: On the characterization of some proteolytical and nonproteolytical bacterian species of the genus *Pseudomonas*. A total of 298 strains belonging to the fluorescent group of the genus *Pseudomonas* were isolated from samples taken from the Überlinger See (Bodensee). 174 of these strains cause gelatin to liquidize. The ability of liquidizing gelatin for the most part goes together with the production of lecithinase. 64 of the liquidizing strains showed lysis of human and wether blood and produced a polypeptid which is toxical for amoebae. All of the non-liquidizing strains proved to be non-toxical for amoebae.

EINLEITUNG

Bei der bakteriologischen Untersuchung sowohl von Abwässern als auch von Proben aus ordnungsgemäß installierten Brunnen ist *Pseudomonas fluorescens* häufig nachzuweisen. Knorr et al. berichteten 1956 über ihre Beobachtungen bezüglich des Versagens der biologischen Sperre bei der Entkeimung des versinkenden Oberflächenwassers. Sie fanden unter 300 Fluoreszenten-Stämmen 193 Stämme, die auf Amöben ausgesprochen vergiftend wirkten; das waren 64 % aller Stämme. 1958 gelang es Gräf, aus *Pseudomonas fluorescens*-Kulturen den protostatisch-protociden Wirkstoff, ein Polypeptid mit einer daran gebundenen Säure, darzustellen. Gräf & Bickel beschrieben 1961 die Wirkung des von Gräf dargestellten Hemmstoffes auf Amöben und Ciliaten.

An 298 Fluoreszenten-Stämmen von der Oberfläche und aus 60 m Tiefe des Überlinger Sees (Bodensee) sowie aus Filterschlamm und Netzplankton versuchten wir festzustellen, wieviele Stämme jeder gefundenen Fluoreszentenart Hemmstoff bilden und in welchen wichtigen Eigenschaften sie sich sonst voneinander unterscheiden.

UNTERSUCHUNGSGANG

Unsere Proben wurden auf Mouton-Agar aufgespatelt und bei 220 C bebrütet. Alle darauf angegangenen cytochromoxydase-positiven Keime wurden nach einer

¹ Herrn Professor Dr. Adolf Bückmann zum 65. Geburtstag in Verehrung gewidmet.
² Diese Untersuchungen wurden 1961 im Rahmen einer bakteriologischen Bodenseeuntersuchung am Hygienisch-bakteriologischen Institut der Universität Erlangen (Leiter: Prof. Dr. M. Knorr) durchgeführt.

Bouillonpassage auf Kingschem "Fluorescinmedium" auf Fluorescinbildung geprüft. Wir machten dabei die Beobachtung, daß eine besonders gute Farbstoffbildung erreicht wird, wenn man die Kulturen nach viertägiger Bebrütung bei 22° C eine Woche lang bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt. Grundsätzlich kamen nur solche Stämme zur Untersuchung, die auf Kingschem Medium fluoreszierenden Farbstoff bildeten. Die Fähigkeit, Gelatine zu verflüssigen, wurde im Röhrchen mit 8 %oiger Gelatine geprüft. Gleichzeitig stellten wir mit allen Fluoreszenten die Eigelbreaktion zum Lecithinasenachweis an, zuerst im flüssigen Medium, bei zweifelhaftem Ausfall auch auf dem Agar-Nährboden (KLINGE 1957).

Laktosespaltung prüften wir im Schrägröhrchen auf dem Medium nach Hugh & Leifson. Zur Begutachtung der Begeißelung wurde stets von 24 bis 48 Stunden alten Schrägagarkulturen ausgegangen. Die Darstellung der Geißeln erfolgte nach der Methode von Leifson oder von Toda.

Die Hämolysefähigkeit wurde geprüft auf 2 %-Menschenblutplatten und dünn gegossenen 8 %--Hammelblutplatten, auf welche die Keime aus 24 Stunden alten Bouillonkulturen verimpft wurden. Gelatineverflüssigung und Eigelbreaktion wurden 14 Tage lang kontrolliert, die Laktoseröhrchen beobachteten wir 4 Wochen lang, während die endgültige Auswertung der Blutplatten nach 7 Tagen erfolgte. Zum Nachweis der Protozoenhemmung wurde eine Amöbe vom Limax-Typ verwendet. Frische Amöbenkulturen konnten dadurch erhalten werden, daß wir Einzeltiere auf Moutonplatten übertrugen, welche gut von Aerobacter aerogenes bewachsen waren. Die auf Hemmstoffproduktion zu untersuchenden Fluoreszenten wurden aus 24 Stunden alten Bouillonkulturen strichförmig auf Moutonplatten verimpst. Waren die Fluoreszenten-Kolonien nach 2 bis 3 Tagen gut herangewachsen, so wurde mit der Nadel eine winzige Menge des Substrates der "Amöben-Freßplatte" jeweils etwa 1 mm vor den Rändern der Kolonien auf dem Nährboden abgestrichen. Die Hemmwirkung prüften wir mikroskopisch nach 6, 24 und 48 Stunden; meist änderte sich bereits nach 6 Stunden nichts mehr am endgültigen Ergebnis. Die Hemmwirkung wurde positiv bewertet, wenn die Amöben lysiert wurden, beziehungsweise wenn sie enzystierten oder sich von der Bakterienkolonie wegbewegten. Die Hemmung wurde als negativ bezeichnet, wenn die Amöben bis an die Fluoreszentenkolonie heranwuchsen oder in sie eindrangen.

EIGENSCHAFTEN DER UNTERSUCHTEN FLUORESZENTEN

Bei allen Stämmen konnte in Bouillon die Ausbildung eines Oberflächenhäutchens beobachtet werden, das mitunter auch nur durch "Schollenbildung" angedeutet war. Bei der Mehrzahl der Keime trat von der Oberfläche der Bouillon ausgehend nach mehreren Bebrütungstagen verschieden stark ausgeprägte Fluoreszenz auf. Ein Sediment in der Kuppe der Kulturröhrchen fand sich nach einigen Tagen in der Bouillonkultur bei allen Stämmen.

30 Stämme der Gelatineverflüssiger (17 % der Verflüssiger) spalteten Laktose, bei den Nichtverflüssigern waren es 4 Stämme (3 % der Nichtverflüssiger). Dieser Befund steht bisherigen Angaben entgegen, nach denen P. fluorescens Laktose nicht spalten kann. Es ist zu bemerken, daß eine hydrolytische Spaltung der Laktose bei der

298 R. Ruschke

üblichen Sterilisation im Dampftopf eintreten kann. Eine bakterielle Verwertung der freigesetzten Dextrose würde dann eine Laktosespaltung durch die Bakterien vortäuschen. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde die Laktose in Lösung steril membranfiltriert und hierauf dem auf etwa 60° C abgekühlten Agar beigemischt. Nach 7 bis 14 Tagen änderte sich nichts mehr am Ausgang dieser Reaktion.

Die Untersuchung der 298 von uns isolierten Stämme auf Begeißelung ergab, daß 3 Stämme von P. putida 1 bis 2 subpolare Geißeln und 265 der übrigen Stämme 3 bis mehrere subpolare Geißeln besaßen. 30 unserer Stämme waren unbeweglich und nicht begeißelt. Unter ihnen fanden sich 3 Gelatineverflüssiger, einer hiervon bildete Hemmstoff. Dieser "Hemmer" fiel seines jasminartigen Geruches wegen auf, er könnte (nach Bergey) P. smaragdina oder P. chlorina sein. Die beiden anderen unbegeißelten Verflüssiger dürften Varianten von P. fluorescens sein. Bei den 27 unbegeißelten, Gelatine nicht verflüssigenden Keimen handelt es sich um Stämme von P. fluorescens non liquefaciens immobilis Eisenberg. Die von uns aufgefundenen Stämme der Gelatineverflüssiger erwiesen sich in überwiegender Mehrheit als solche von P. fluorescens, jene der Nichtverflüssiger als solche von P. putida. Diese beiden Keime werden sehr häufig als miteinander identisch betrachtet, sie unterscheiden sich jedoch deutlich voneinander, besonders durch ihr verschiedenes Temperatur-Optimum und ihr unterschiedliches Verhalten gegenüber Gelatine (KLINGE 1959).

Nach Feststellungen von KLINGE & GRÄF (1959) ist die Menge des produzierten Hemmstoffes für den jeweiligen Vergiftungsgrad der Amöben und für die Hämolyse verantwortlich, wobei Hämolyse schon durch geringe Hemmstoffkonzentrationen erfolgt, ohne daß gleichzeitig Amöben sichtbar geschädigt werden. Dabei erweisen sich menschliche Erythrozyten wiederum als empfindlicher als Hammelerythrozyten. Hierdurch erklärt sich die Tatsache, daß wir eine größere Zahl von Gelatineverflüssigern

Tabelle 1 Übersicht über Eigenschaften proteolytischer und nichtproteolytischer Bakterienstämme

Kriterion	177 Gelatineverflüssiger davon 174 Pseudomonas fluorescens	davon
Mit Lecithinase	168	2
Ohne Lecithinase	6	122
Hämolyse von Menschen- und Hammelerythrozyten und Amöbenhemmung	64	keiner
Hämolyse nur von Menschen- erythrozyten	51	15 (10 davon schwach)
Mit Amöbenlyse	46	keiner
Mit toxischer Wirkung auf Amöben	18	keiner
⁰ /o Amöbenhemmer der Gelatineverflüssiger	36	
⁰ / ₀ Amöbenhemmer der gesamten Fluoreszentenstämme	21,5	0

fanden, die wohl Menschenerythrozyten lysierten, Amöben jedoch nicht vergifteten. Aus einer Gegenüberstellung proteolytischer und nichtproteolytischer Stämme (Tab. 1) wird ersichtlich, daß sich beide Gruppen deutlich unterscheiden hinsichtlich ihrer Hämolysefähigkeit, Amöbenhemmung und Lecithinspaltung.

DISKUSSION

Von unseren 298 Fluoreszentenstämmen zeigten 21,5 % Hemmwirkung gegen Amöben. Praktisch kamen nur Stämme von P. fluorescens als Hemmstoffproduzenten in Frage. Ein Vergleich unserer Werte mit jenen von KNORR et al. (1956) legt die Vermutung nahe, daß im damaligen Probenmaterial die Stämme von P. fluorescens gegenüber den nichtverflüssigenden Fluoreszentenstämmen in überwiegender Mehrzahl vorhanden waren. Möglicherweise findet auf Grund von Filtrationsvorgängen im Boden eine Anreicherung von proteolytisch aktiven und hemmstoffbildenden Fluoreszenten statt. Bei unseren Proben, die dem Überlinger See, den oberen Schichten eines Sandfilters (es wird Wasser aus 60 m Tiefe des Überlinger Sees filtriert) und Netzplankton entstammten - also einem "offenen System", - fiel niemals ein besonderes Übergewicht von Hemmstoffbildnern auf. Es wäre interessant, die Suche nach derartigen psychrophilen, hemmstoffbildenden Fluoreszenten in verschiedenen Biotopen fortzusetzen, um zu sehen, in welchem Maße eine Selektion ihre relative Abundanz verschieben kann. Derartige Untersuchungen könnten für die Mitbeurteilung der Vorgänge im lebenden Rasen biologischer Kläranlagen von großem praktischem und theoretischem Interesse sein.

ZUSAMMENFASSUNG

- 1. Von 298 geprüften Fluoreszenten-Stämmen erwiesen sich 174 als Gelatineverslüssiger. Bis auf 6 Stämme (3,5 % der Verslüssiger) spalteten diese Verslüssiger Lecithin. Bei den Nichtverslüssigern fiel die Prüfung auf Lecithinase nur in 2 Fällen (1,6 % der Nichtverslüssiger) positiv aus. Gelatineverslüssigung und Lecithinspaltung erfolgten also in rund 96 % aller Fälle gleichzeitig.
- 2. Nur bei Gelatineverslüssigern war Hämolyse auf Hammelblutplatten festzustellen. Alle 64 Hammelerythrozyten auflösenden Stämme (36%) der Verslüssiger) erwiesen sich als Amöbenhemmer. Amöbenlyse erfolgte durch 46 Stämme; 18 Stämme wirkten vergistend.
- 3. 51 der gelatineverslüssigenden Stämme (29% der Verslüssiger) zeigten Hämolyse nur auf der Menschenblutplatte, wiesen jedoch keine Amöbenhemmung auf.
- 4. Führt man die Verflüssiger, welche nur Menschenerythrozyten lysieren, zusammen mit jenen, die Hammelerythrozyten auflösen und Amöben sichtbar schädigen, als Hemmstoffbildner, so beläuft sich deren Anteil auf rund 68 % der Gelatineverflüssiger.
- 5. Von 124 Nichtverslüssigern zeigten 15 Stämme Hämolyse nur auf Menschenblut-

300 R. Ruschke

- platten. Es ist nicht bekannt, ob diese Hämolyse ebenfalls durch den von GRÄF bei P. fluorescens-Stämmen gefundenen Wirkstoff verursacht wurde.
- 6. Laktosesäuerung wurde bei 30 Gelatineverflüssigern und bei 4 Nichtverflüssigern gefunden.

ZITIERTE LITERATUR

- Gräf, W., 1958. Über Gewinnung und Beschaffenheit protostatisch-protocider Stoffe aus Kulturen von Pseudomonas fluorescens. Arch. Hyg. Bakt. 142, 267-275.
- & BICKEL, H., 1961. Antibiotische Eigenschaften und Toxizität des Wirkstoffes aus Pseudomonas fluorescens. Arch. Hyg. Bakt. 145, 21-31.
- KLINGE, K., 1957. Die Eigelbreaktion und die Wirkung von Mikroorganismen auf den Eigelb-Komplex. Arch. Hyg. Bakt. 141, 334-347.
- -- 1957. Differenzierung der im Wasser vorkommenden Keime des Genus *Pseudomonas* durch die Eigelbreaktion. *Arch. Hyg. Bakt.* 141, 348-360.
- 1959. Pseudomonas fluorescens, ein Boden- und Wasserkeim. 1. Physiologie und Identifizierung. Arch. Mikrobiol. 34, 270-284.
- & GRÄF, W., 1959. Hämolyse, Eigelb-Reaktion und Amöbenauflösung durch Pseudomonas fluorescens. Zbl. Bakt. Orig. 174, 243-252.
- KNORR, M., HAAS, F. & KNORR, B., 1956. Beobachtungen über das Versagen der biologischen Sperre bei der Entkeimung des versinkenden Wassers. Arch. Hyg. Bakt. 140, 130-139.