2. Arbeitstagung europäischer Fleischforscher
Kulmbach, 29.Juli - 2.August 1956

Gedanken zur Differenzierung der in der Fleischwirtschaft vorkommenden Keimarten

von
Dr. L. Leistner
Bundesforschungsanstalt für Fleischwirtschaft
Kulmbach - Deutschland

Referat

Es hat den Anschein, als ob Schwierigkeiten bei der Differenzierung der Keimarten besonders dann auftreten, wenn die Keime aus einem speziellen Milieu isoliert werden, in dem sie Schädigungen ausgesetzt waren. Fleischkonserven, Rohwurst, Pökellake etc. sind spezielle Nährmedien und Pökelsalze, Rauch, Trocknung, Hitze, Kälte, Säuren sowie Desinfektionsmittel schädigende Einflüsse, durch die eine Differenzierung der in der Fleischwirtschaft vorkommenden Keimarten erschwert werden kann. Spezielle Nährmedien und schädigende Einflüsse können die Eigenschaften einer Keimart verändern, indem sie 1) das Auftreten von Mutanten begünstigen und 2) die aufgetretenen Mutanten selektieren.

Aus der Bakteriengenetik ist bekannt, daß Bakterienkulturen mutieren. Alle für die bakteriologische Diagnostik in Frage kommenden Charakteristika sollen mutierbar sein. Die Häufigkeit der Spontanmutationen wird allgemein mit 10^{-6} bis 10^{-8} pro Generation angegeben. Wenn das Nährmilieu oder die Umweltsbedingungen mutagen sind, dann kann der Prozentsatz der Mutanten wesentlich höher liegen. Schon vom einfachen Kochsalz ist erwiesen, daß es mutationsbegünstigend auf Bakterien wirken kann. Der Rauch enthält Formaldehyd und Phenole, auch diese Substanzen sind für Bakterien mutagen. Durch erhöhte Temperaturen kann die Mutationsrate der Bakterien wesentlich vergrößert werden. Die beim Vorhandensein von mutagenen Substanzen bzw. Einflüssen vermehrt auftretenden Mutanten werden sich jedoch meist auch noch nicht entscheidend auf das Gesamtbild der Kultur auswirken. In speziellen Nährmedien und unter be-

sonderen Umweltsbedingungen kann aber eine Selektion erfolgen, durch die eine Vermehrung bestimmter Mutanten begünstigt wird, während die Keime mit normalem Genotyp immer mehr zurücktreten. Damit kommt es zu einer Wandlung der Kultur. Liegen in einer Kultur Mutanten vor, die sich auf Grund der Zeitproportionalität ihres Auftretens oder infolge Selektion angereichert haben, dann wird die Differenzierung der Keimart sehr erschwert. Die Variation, also die nicht erbliche Veränderung der Bakterien, wird bei der Differenzierung nicht so große Schwierigkeiten bereiten; denn die Variation beeinflußt nur den Phänotyp der Keime, nicht aber ihren Genotyp.

Wie weit die Abweichung einer Keimart von ihren definierten Eigenschaften auf Grund von Mutation mit anschließender Selektion gehen kann, hat uns ein Versuch mit Serratia marcescens gelehrt. Prinzipiell hätte sich der gleiche Versuch mit jeder anderen Keimart durchführen lassen. Es sind von verschiedenen Keimarten schon mehrfach zahlreiche Mutanten beschrieben worden. Wir haben das Chromobacterium prodigiosum gewählt, da sich bei dieser Keimart Mutationen der Koloniefarbe und Kolonieform besonders leicht beobachten lassen.

Von Serratia marcescens in Reinkultur wurde vor etwa 2 Jahren eine zinnoberrote Einzelkolonie in einfache Nährbouillon gebracht. Diese Bouillonkultur haben wir 9 Wochen bei Zimmertemperatur stehengelassen und dann auf einfachen Nähragar ausgestrichen. In dem Ausstrich zeigten sich neben zahlreichen roten auch einige rosa und weiße Kolonien. Eine rote, eine rosa und eine weiße Kolonie haben wir in je eine Nährbouillon überimpft. Der Nähragarausstrich dieser Kulturen nach 5 Wochen Zimmertemperaturaufenthalt zeigte eine Aufspaltung in 20 Mutanten. Diese Mutanten wurden erneut in je eine Nährbouillon überimpft und die Bouillonkulturen diesmal nach 9 Wochen Zimmertemperatur auf Nähragar ausgestrichen. Dabei ergab sich nunmehr eine Aufspaltung in 41 Mutanten. Die Mutanten wurden wieder in je eine Nährbouillon gebracht. In den Nähragarausstrichen dieser Bouillonkulturen waren nach 6 Wochen Zimmertemperaturaufenthalt 101 Mutanten nachweisbar.

Auf diese einfache Weise haben wir die bei der Alterung von

Bouillonkulturen auftretenden Mutanten durch Isolierung selektiert und in der Überimpfungsbouillon ihre weitere Aufspaltung abgewartet. Der Versuch wurde nach 7 Monaten abgebrochen, da der Beweis geführt war, wie weit sich das Erscheinungsbild einer Keimart durch Mutation verbunden mit Selektion abwandeln kann.

Die Mutanten haben wir nach ihrem Koloniewachstum auf Nähragar ausgewählt. Es traten Unterschiede in Farbe, Form, Größe und Konsistenz der Kolonien, im Geruch der Keimrasen sowie in der Wachstumsrate der Kulturen auf. Alle Mutanten erwiesen sich zur Zeit der Isolierung als erbrein. Es handelte sich also tatsächlich um Mutanten. Es braucht nicht betont zu werden, daß die isolierten Mutanten nicht nur Verunreinigungen waren, die sich während des lange fortgesetzten Versuches irgendwie eingeschlichen haben. Auch bei stark abweichenden Mutanten konnten wir im Verlauf der weiteren Aufspaltung häufig zinnoberrote Remutanten beobachten und dadurch war erwiesen, daß auch diese extremen Mutanten Abkömmlinge von Serratia marcescens waren.

Unterschiedliche Mutanten zeigten bei ihrer Aufspaltung nicht selten Tochtermutanten, die sich in ihrem Koloniewachstum auf Nähragar glichen. Wir haben Tochtermutanten mit gleichem Koloniewachstum als selbständige Mutanten angesehen, wenn sie von verschiedenen Ausgangsmutanten abstammten; denn diese Tochtermutanten verhielten sich bei ihrer weiteren Aufspaltung meist unterschiedlich. Von den 101 Mutanten der letzten Isolierung zeigten nur 52 Mutanten deutliche Unterschiede in ihrem Koloniewachstum auf Nähragar. Die übrigen Mutanten wiesen keine einmaligen Kolonietypen auf, stammten aber von anderen Ausgangsmutanten ab. Sämtliche 101 Mutanten wurden auf ihr Verhalten gegenüber Traubenzucker und auf ihre Morphologie geprüft. Dabei zeigte sich, daß auch diese Merkmale mutiert waren. Meist bestand kein Zusammenhang zwischen der Richtung der Mutation des Koloniewachstums und der Richtung der anderen Mutationen. Daher ergab sich, daß unter den 101 Mutanten nur ganz wenige waren, die wenigstens in den 3 geprüften Merkmalen (Koloniewachstum auf Nähragar, Traubenzuckerspal-

Bouillonkulturen auftretenden Mutanten durch Isolierung selektiert und in der Überimpfungsbouillon ihre weitere Aufspaltung abgewartet. Der Versuch wurde nach 7 Monaten abgebrochen, da der Beweis geführt war, wie weit sich das Erscheinungsbild einer Keimart durch Mutation verbunden mit Selektion abwandeln kann.

Die Mutanten haben wir nach ihrem Koloniewachstum auf Nähragar ausgewählt. Es traten Unterschiede in Farbe, Form, Größe und Konsistenz der Kolonien, im Geruch der Keimrasen sowie in der Wachstumsrate der Kulturen auf. Alle Mutanten erwiesen sich zur Zeit der Isolierung als erbrein. Es handelte sich also tatsächlich um Mutanten. Es braucht nicht betont zu werden, daß die isolierten Mutanten nicht nur Verunreinigungen waren, die sich während des lange fortgesetzten Versuches irgendwie eingeschlichen haben. Auch bei stark abweichenden Mutanten konnten wir im Verlauf der weiteren Aufspaltung häufig zinnoberrote Remutanten beobachten und dadurch war erwiesen, daß auch diese extremen Mutanten Abkömmlinge von Serratia marcescens waren.

Unterschiedliche Mutanten zeigten bei ihrer Aufspaltung nicht selten Tochtermutanten, die sich in ihrem Koloniewachstum auf Nähragar glichen. Wir haben Tochtermutanten mit gleichem Koloniewachstum als selbständige Mutanten angesehen, wenn sie von verschiedenen Ausgangsmutanten abstammten; denn diese Tochtermutanten verhielten sich bei ihrer weiteren Aufspaltung meist unterschiedlich. Von den 101 Mutanten der letzten Isolierung zeigten nur 52 Mutanten deutliche Unterschiede in ihrem Koloniewachstum auf Nähragar. Die übrigen Mutanten wiesen keine einmaligen Kolonietypen auf, stammten aber von anderen Ausgangsmutanten ab. Sämtliche 101 Mutanten wurden auf ihr Verhalten gegenüber Traubenzucker und auf ihre Morphologie geprüft. Dabei zeigte sich, daß auch diese Merkmale mutiert waren. Meist bestand kein Zusammenhang zwischen der Richtung der Mutation des Koloniewachstums und der Richtung der anderen Mutationen. Daher ergab sich, daß unter den 101 Mutanten nur ganz wenige waren, die wenigstens in den 3 geprüften Merkmalen (Koloniewachstum auf Nähragar, Traubenzuckerspal-

tung, Morphologie) übereinstimmten. Unter den 101 Mutanten war nur noch ein einziger Stamm, der sich in den 3 geprüften Merkmalen wie die Ausgangskultur von Serratia marcescens verhielt.

Es sollte weiter geprüft werden, ob sich die Mutanten in Mischkultur mit den von ihnen gebildeten Tochtermutanten behaupten können. Dazu wurden für den zweiten Teil des Versuches von den 101 Mutanten die 52 Mutanten ausgewählt, die sich in ihrem Koloniewachstum deutlich unterschieden. Diese 52 Mutanten haben wir in einfache Nährbouillon gebracht und die Kulturen 4mal, immer im Abstand von 16 Wochen, in eine neue Nährbouillon überimpft. Der zweite Teil des Versuches erstreckte sich also über einen Zeitraum von 16 Monaten. Erst nach dieser Zeit wurden die 52 Bouillonkulturen auf Nähragar ausgestrichen. Die 52 Ausgangsmutanten hatten sich folglich 16 Monate lang in Mischkultur mit den von ihnen gebildeten Tochtermutanten befunden. In diesen Mischkulturen haben sich diejenigen Mutanten am besten behauptet, die den übrigen an Vitalität überlegen waren. Meist fanden sich nun 2 bis 3 Mutanten vorherrschend, die sich in ihrem Koloniewachstum fast immer stark von der Ausgangsmutante unterschieden. Nur ausnahmsweise war die Ausgangsmutante noch dominierend. Im allgemeinen erwiesen sich zinnoberrote Remutanten vitaler als die weißlichen oder blassen Ausgangsmutanten. Die zinnoberroten Remutanten sind in den Mischkulturen oft anteilmäßig immer mehr in den Vordergrund getreten, bis sie vorherrschend waren und dann erneut der Aufspaltung anheimgefallen sind. Extreme Ausgangsmutanten wurden stark zurückgedrängt, sie sind anscheinend nur in Reinkultur existenzfähig.

Der Versuch mit Serratia marcescens hat uns bestätigt, daß sich 1) die Eigenschaften einer Keimart durch Mutation entscheidend verändern können und daß sich 2) die Mutation besonders dann auswirken wird, wenn die Mutanten einen Selektionsvorteil haben.

Für die Anaerobendifferenzierung haben wir aus den Mutationsversuchen den Schluß gezogen, daß es zweckmäßig sein wird, die Anaerobenarten vor der Differenzierung einer Vorbereitung zu unterwerfen, die in 3 Stufen durchgeführt wird: A) Auf-

frischung, B) Reinkulturgewinnung, C) Anpassung.

Zur Auffrischung werden die pathogenen Anaerobenarten an Versuchstiere verimpft, wie dies schon von ZEISSLER u.a. empfohlen wurde. Apathogene Keimarten werden unter den Bedingungen gezüchtet, die ihrem natürlichen Vorkommen am ehesten entsprechen. Auf diese Weise soll der normale Genotyp angereichert werden, so daß bei der anschließenden Reinkulturgewinnung die Chance besteht, daß aus einer hohen Verdünnung der Kultur Keime mit normalem Genotyp isoliert werden.

Nach der Auffrischung wird die Reinkulturgewinnung durchgeführt. Zur Reinkulturgewinnung von Anaerobenarten verwenden wir neben der abgestuften Erhitzung vor allem die Überschichtungsplatte.

Für die Anpassung benutzen wir ein Fleischmedium, das aus 25 g gewolftem, fettfreiem und ungesalzenem Rind- und Schweinefleisch im Verhältnis 1:1 mit 5 ccm einfacher Nährbouillon besteht. Dieses Fleischmedium bietet fast allen für die Fleischwirtschaft bedeutungsvollen Anaerobenarten optimale Wachstumsbedingungen. Indem wir die Anaeroben vor der Differenzierung regelmäßig noch einmal in diesen nährstoffreichen und für die Fleischwirtschaft typischen Nährboden überimpfen, wollen wir den Stämmen ein einheitliches, ihnen entsprechendes Enzymgepräge vermitteln, so daß verschiedene Stämme der gleichen Anaerobenart möglichst immer mit der gleichen Enzymstruktur zur Differenzierung kommen. Auf diese Weise wird der enzymatischen Adaptation im Sinne KARSTRÖM's Rechnung getragen und damit der störende Einfluß der Variation vermindert. Aus dem Fleischmedium werden 10 Leberbouillonröhrchen beimpft, die wir bis zum deutlichen Wachstum bebrüten und anschließend im Kühlschrank aufbewahren. Von diesen Stockkulturen ausgehend, werden die verschiedenen Differenzierungsreaktionen vorgenommen.

Ich hatte die Absicht, dazulegen, daß die speziellen Nährmedien und die in der Fleischwirtschaft üblichen Konservierungsmethoden eine Wandlung der Keimarten infolge Mutation verbunden mit Selektion herbeiführen können. Die Differenzierung mutierter Keimarten muß als sehr schwierig, wenn nicht unmöglich angesehen werden. Diese Differenzierungsschwierigkeiten

lassen sich umgehen, wenn man die Keimarten auf ihren normalen Genotyp zurückführt.

Die Darlegungen werden im Vortrag durch 25 Diapositive veranschaulicht.

Literatur:

BOIVIN, A.: Bakteriengenetik. Zbl. Bakt. I Orig. 155, 58 (1950)

GOTTSCHEWSKI, G.: Die Genetik der Mikroorganismen. Zbl. Bakt. I Orig. 155, 31 (1950)

HARM, W.: Genetische Betrachtungen zur Frage der Reinheit von Bakterien-Kulturen. Zbl. Bakt. I Orig. 162, 153 (1955)

KAPLAN, R.W.: Neuere Entwicklungen in der Mikrobengenetik. Zbl. Bakt. I Orig. 160, 181 (1953)

Bei diesen Autoren finden sich ausführliche Literaturangaben.