

## Neue Methoden zur Isolierung chitinabbauender Bakterien

F. STREICHSBIER

### 1. Einleitung und Problemstellung

Chitin spielt neben den anderen Polysacchariden innerhalb des Kohlenstoffkreislaufes eine bedeutende Rolle. Das an natürlichen Standorten auftretende Chitin stammt aus dem Bestandsabfall niederer Tiere und aus der permanenten mikrobiologischen Biosynthese. So wird Chitin in den Zellwänden zahlreicher Pilze (1), in den Sproßnarben von Hefen (2) und nach neueren Untersuchungen auch in bestimmten Algen (3) gebildet. Die Mineralisation des Chitins erfolgt in der Natur vorzugsweise durch bakteriellen Abbau, wobei im Boden hauptsächlich Streptomyzeten an diesen Vorgängen beteiligt sind (4).

Trotz der zweifelsohne erkannten Bedeutung des Chitins im Stoffkreislauf der Ökosysteme existieren nur wenige wissenschaftliche Publikationen, die darauf Bezug nehmen (4, 5, 6, 7). Mitbestimmend für die geringe Anzahl an Publikationen aus diesem Themenkreis ist sicher die relativ komplizierte und noch nicht genügend ausgereifte Arbeitsmethodik. Darüber hinaus wird von vielen Autoren meist chemisch vorbehandeltes Chitin verwendet. Dies wirft die Frage nach der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Verhältnisse am natürlichen Standort auf.

Die vorliegende Arbeit geht vor allem auf methodische Grundlagen ein und soll durch detaillierte Beschreibung

einzelner Verfahrensschritte sowie durch das Aufzeigen neuer Arbeitsvarianten, einen leichteren Zugang zu dem beschriebenen Themenkreis ermöglichen und somit Grundlagen für weiterführende Arbeiten liefern.

## 2. Material und Medien

### 2.1 Herstellung von Chitinstreifen

Hummerschalen werden, vorerst grob von Fleischresten befreit, mehrmals mit heißem Wasser gespült und anschließend 7 Tage unter täglichem Säurewechsel bei Raumtemperatur in 1 %iger Salzsäure eingeweicht. Nach diesem Entkalkungsvorgang werden die Schalen mehrmals mit kochendem destilliertem Wasser bis zum Erreichen eines neutralen Waschnwassers gespült. Die nun lederartigen Schalen werden in Streifen (5 mm x 50 mm) geschnitten und über einen Zeitraum von 10 Tagen in 2 %iger Kalilauge eingelegt. Innerhalb dieser Zeitspanne wird die Lauge dreimal erneuert und täglich einmal zum Sieden erhitzt. Eine ausreichende Entfernung von Pigmentstoffen und begleitenden organischen Bestandteilen kann dann angenommen werden, wenn die zuletzt verwendete Kalilauge nur mehr schwache Färbung zeigt und die Chitinstreifen keinerlei Pigmentierung aufweisen. Nachdem die Streifen mit destilliertem Wasser vollständig alkalifrei gewaschen worden sind, folgt eine kurze Vortrocknung bei 70 °C. Danach wird dreimal in 96 %igem Ethanol aufgekocht und abermals bei 70 °C getrocknet. In ihren Grundzügen entspricht diese Vorgangsweise der von SKERMAN (8) beschriebenen Methode. Die vorgenommenen Änderungen, wie täglicher Säurewechsel und mehrmalige Erneuerung der Lauge, bewirkten höhere Reinheit des Endproduktes.

## 2.2. Herstellung von kolloidalem Chitin

50 g käufliches, pulverisiertes Chitin (z.B. SIGMA Nr. C-3387) werden in 500 ml kalter 37 %iger HCl suspendiert und 45 Minuten stark gerührt. Anschließend wird der nicht gelöste Anteil über eine Glassinternutsche (G 1) abfiltriert und das salzsaure Filtrat über einen Tropftrichter in 3 Liter Eiswasser eingebracht. Das ausgefallene kolloidale Chitin wird auf einer Nutsche über ein grobes Papierfilter (MACHEREY & NAGEL, Nr. 651) unter Abpressen des Filterkuchens abgesaugt. Der Rückstand wird anschließend in 5 Liter Wasser suspendiert und erneut filtriert. Es empfiehlt sich, diesen Vorgang bis zum Erreichen eines neutralen pH-Wertes in der Suspension zu wiederholen, was in der Regel nach 4 - 5 maligem Waschen der Fall ist. Nach Ermittlung des Wassergehaltes des Preßkuchens (Trocknung bei 105 °C) wird eine Suspension des kolloidalen Chitins von 5 g Trockensubstanz/100 ml hergestellt. Diese wird sterilisiert und im Kühlschrank gelagert.

Durch diese Vorgangsweise erhält man ein weitgehend von störenden Salzen freies Produkt.

## 2.3. Medien

Alle Medien wurden auf einen pH von 7,2 gebracht und 15 Minuten bei 121 °C sterilisiert.

### 2.3.1 Mineralsalzlösung A nach SKERMAN (8)

$K_2HPO_4$		1 g	$FePO_4$	2 $H_2O$	0,001 g
$MgSO_4$	7 $H_2O$	0,5 g	$NH_4Cl$		1,0 g
NaCl		0,5 g	aqu.dest.		1000 ml
$CaCl_2$	2 $H_2O$	0,1 g			

## 2.3.2. Mineralsalzlösung B nach RINGER (9)

NaCl	2,25 g	NaHCO <sub>3</sub>	0,05 g
KCl	0,105 g	NH <sub>4</sub> Cl	0,105 g
CaCl <sub>2</sub>	0,045 g	aqu.dest.	1000 ml

## 2.3.3. Mineralsalzlösung C

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3 g
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0,3 g
NaCl	0,3 g
aqu.dest.	1000 ml

## 2.3.4. Chitinstreifen - Mineralsalz Flüssigmedium

Je 5 ml der Mineralsalzlösungen A, B oder C wurden in Epprouvetten eingebracht, jeweils 1 Chitinstreifen zugefügt und nochmals sterilisiert.

## 2.3.5. Chitin - Agar

Für die Untersuchungen wurden Agarplatten mit 0,5 % kolloidalem Chitin und 1,2 % bzw. 2 % Agar (MERCK Nr.1614 od.1613) verwendet. Der nachfolgend beschriebene Herstellungsablauf ist unbedingt einzuhalten, da Abweichungen inhomogene Endprodukte zur Folge haben können.

In 500 ml kalter Mineralsalzlösung C werden 12 g bzw. 20 g Agar suspendiert und 10 Minuten quellen gelassen. Nach 10 Minuten Erhitzen am kochenden Wasserbad werden die restlichen 400 ml der Mineralsalzlösung zugegeben. Unter stetigem Rühren wird nun weitere 20 Minuten bis zur vollständigen Auflösung des Agars erhitzt. In der Praxis ist das vollständige Auflösen des Agars am Auftreten zahlreicher Bläschen sowie an leichter Opaleszenz erkennbar. Erst ab

diesem Zeitpunkt dürfen 100 ml der kolloidalen Chitin-suspension unter starkem Rühren zugefügt werden. Danach wird noch 5 Minuten erhitzt und unter Rühren zu je 5 ml in Epruvetten abgefüllt.

### 3. Methodik

#### 3.1. Probenahme

Die Wasserproben wurden dem Mauerbach bei Wien entnommen. Zur Auswertung gelangten in der Regel 2 parallel gezogene Proben, die in mindestens doppelt geführten Versuchsansätzen untersucht wurden. Die Proben wurden unverdünnt oder nach Verdünnung mit RINGER - Lösung (9) in die Versuchsansätze eingebracht. Alle Verdünnungen erfolgten in Zehnerpotenzschritten.

#### 3.2. Zahlenmäßige Erfassung

Für die Bestimmung der Anzahl chitinabbauender Bakterien kamen 4 kulturelle Zählverfahren zur Anwendung: Als Flüssigkulturverfahren die Methode der "most probable numbers" (MPN), in der Auswertung nach Mc CRADY (10) und das Reihenverdünnungsverfahren mit Mehrfachansätzen und statistischer Mittelwertbildung. Hierbei wurden unter Verwendung der Mineralsalzlösungen A bis C jeweils 5 ml dieser Grundnährlösungen vorgegeben und ein Chitinstreifen der zu ca. 1/3 über die Flüssigkeitsoberfläche hinausragte, eingebracht. Die Beschickung der so präparierten Röhrchen erfolgte mit jeweils 1 ml Probe. Die Bebrütungstemperaturen lagen bei 20°C, 30°C und 37°C, daraus ergeben sich notwendige Inkubationszeiten von 30 bis 10 Tagen.

Als Kulturverfahren mit erstarrenden Medien kamen das Gußplattenverfahren und die Methode nach DRIGALSKI zur Anwendung. Hierfür wurde vorerst mit je 15 ml 2 %igem Mineralsalzagar die Grundschrift hergestellt, die nach dem Erstarren mit je 5 ml Chitinagar überschichtet wurde. Das Gußplattenverfahren konnte nach der üblichen Methode ohne Schwierigkeiten durchgeführt werden. Nach Vorlage von 1 ml der entsprechenden Wasserprobe wurde mit 5 ml des auf 48°C temperierten 1,2 %igen Chitinagars überschichtet. - Schwieriger gestaltete sich die Herstellung der zur Oberflächenbeimpfung vorgesehenen Platten. Das gleichmäßige Ausbringen des hochviskosen 2 %igen Chitinagars auf der erstarrten Grundschrift ist ohne zusätzliche Maßnahmen kaum möglich. Obwohl hier der frisch aufgeschmolzene Deckschichtagar heiß aufgebracht werden kann, war es selbst bei Agartemperaturen um 90°C nicht möglich, genügend rasch eine gleichmäßige Verteilung und damit eine glatte Oberfläche zu erreichen. Als limitierender Faktor konnte die Temperatur des Grundschriftagars festgestellt werden. Zur Lösung des Problems wurden die Grundschriftplatten kurz vor der Überschichtung 2-3 Minuten im strömenden Wasserdampf (z.B. auf erhöhter Siebplatte eines Certoklaven) vorgewärmt und danach sofort mit 5 ml des auf 60°C gehaltenen und gut durchmischten Chitinagars überschichtet. - Die Oberflächenbeimpfung erfolgte mit jeweils 0,05 ml Probe. Die hinreichenden Inkubationszeiten lagen für die oben genannten Bebrütungstemperaturen bei 8 bis 2 Tagen.

Die Festlegung der untersuchten Wachstumsparameter erfolgte in folgender Weise: Für die Versuche über den Einfluß des pH-Wertes wurde dieser durch Zugabe von 0,1 n HCl bzw. 0,1 n NaOH zu den Ansätzen in einem Bereich von pH 4 bis pH 10 variiert. Um den Einfluß der Chitinkonzentration zu bestimmen, wurden kolloidale Chitinsuspensionen im Bereich von 0,1 % bis 5 % direkt aus dem Preßkuchen hergestellt.

### 3.3. Isolierung und Kultivation

Zur Gewinnung von Reinkulturen wurden Proben aus den letztbewachsenen Reihen der MPN- und Reihenverdünnungsansätze sowie von den Chitinagarplatten entnommen und auf neuen Chitinagarplatten ausgestrichen. Die entwickelten Einzelkolonien wurden in Chitinstreifenmedium und wieder auf Chitinagarplatten übertragen. Es sei vorweggenommen, daß diese üblicherweise praktizierte Vorgangsweise keine allgemein zufriedenstellenden Ergebnisse brachte und erst bei Vorgang nach einem neu entwickelten Schema (siehe Abb.2) auch die Erfassung empfindlicher Stämme möglich war.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Zählergebnisse

#### 4.1.1. Einfluß der Mineralsalzlösung

Die Verwendung verschiedener Mineralsalzlösungen hatte keinen Einfluß auf die zahlenmäßigen Endwerte. Die Ergebnisse identer Zählverfahren zeigten Standardabweichungen zwischen 12 % und 17 %. Da diese Werte für die vorliegenden Untersuchungen durchaus üblich sind, konnte ein direkter Einfluß von verschieden zusammengesetzten Grundsatzlösungen nicht festgestellt werden. Es wurden jedoch bezüglich der Auswertungsmöglichkeiten bei den Flüssigansätzen Unterschiede festgestellt. Bei Ansätzen mit der in der einschlägigen Literatur empfohlenen Mineralsalzlösung A (8) ist eine frühzeitige Erkennung des Chitinabbaues nicht möglich, da solche Ansätze schon vor der Probeneintragung durch ausgefallene Nährmedienbestandteile getrübt sind. Diese Trübung überlagert aber jene durch den bakteriellen Bewuchs hervorgerufene, so daß erst nach längeren Bebrütungszeiten sichere Aussagen über Wachstumsvorgänge möglich sind. Dies kommt

besonders bei den schwächer bewachsenen Röhrchen höherer Verdünnungsstufen zum Tragen.

Die käufliche RINGER-Lösung (MERCK Nr. 10113) schien zunächst eine bessere Alternative zu sein. Der vorgegebene pH-Wert liegt im Idealbereich und mediumbedingte Trübungen treten nicht auf. Jedoch wurden geringere Wachstumsgeschwindigkeiten als in den beiden anderen Medien festgestellt und daher längere Bebrütungszeiten benötigt.

Die besten Eigenschaften zeigte die einfach zusammengesetzte, stickstofffreie Mineralsalzlösung C. Die klare Lösung ermöglicht die frühzeitige Erkennung stattgefundener Abbauprozesse und bietet im Vergleich zur RINGER-Lösung höhere Wachstumsgeschwindigkeiten.

Für die Versuche mit Chitinagarplatten konnten in diesem Zusammenhang keine signifikanten Unterschiede gefunden werden.

#### 4.1.2. Einfluß der Bebrütungstemperatur

In Tabelle 1 ist die Abhängigkeit der nach Gußplatten- bzw. MPN - Methode ermittelten Keimzahlen von der Bebrütungstemperatur dargestellt. Die Werte zeigen, daß eine Inkubation bei 37°C keinesfalls zu relevanten Ergebnissen führt, da je nach Verfahren nur 30 - 40 % der auftretenden chitinolytischen Keime erfaßt werden. Als optimale Arbeitstemperatur kann allgemein jene von 30 °C angesehen werden. Die quantitativen Ergebnisse liegen hier zwar geringfügig niedriger als bei 20°C, die nötige Inkubationszeit ist jedoch deutlich kürzer, ein Umstand, der besonders bei Ansätzen in Chitinstreifenmedium deutlich zum Ausdruck kommt, wobei sichere Ergebnisse um etwa 8 Tage früher erzielt werden können. Aber auch beim Plattenverfahren haben sich 30 °C als optimale Bebrütungstemperatur herausgestellt. Hier liegen die

Tabelle 1

Abhängigkeit der Zählergebnisse von der Bebrütungstemperatur

Bebrütungstemperatur	GUSSPLATTENVERFAHREN			MPN		
	20 °C	30 °C	37 °C	20 °C	30 °C	37 °C
Bebrütungsdauer in Tagen	KEIME / ML					
2	NULL	1.060	443	NULL	NULL	187
4	612	1.131	-	NULL	240	377
8	1.398	-	-	66	313	477
12	-	-	-	277	667	-
16	-	-	-	540	1.373	-
20	-	-	-	793	-	-
24	-	-	-	1.600	-	-
30	-	-	-	-	-	-

Vorteile vor allem in besseren Auswertungsmöglichkeiten, da bei dieser Temperatur einerseits schärfere und damit besser qualifizierbare Klärzonen auftreten und andererseits die höhere Wachstumsrate bewirkt, daß nahezu alle Kolonien bereits im ersten Zählgang d.i. nach 2 Tagen erfaßt werden können.

#### 4.1.3. Einfluß des pH- Wertes

Die entsprechenden Untersuchungsergebnisse für Gußplatten- und MPN-Verfahren sind in Abbildung 1 graphisch dargestellt. Die chitinolytischen Bakterien zeigen besonders im sauren Bereich hohe Empfindlichkeit; so kommen bei pH 6 nur etwa 15 % der möglichen Kolonien zur Entwicklung. Im Vergleich dazu zeigt die Gesamtpopulation unter denselben Bedingungen eine Überlebensrate von 60 % (Nährmedien: Standard - I - Nähragar und Standard I - Nährbouillon). Die oben erwähnte hohe Empfindlichkeit ist wahrscheinlich auf das Zusammenwirken von pH-Wert und hochselektivem Nährmedium zurückzuführen.

Der für die Erfassung von chitinabbauenden Bakterien gefundene optimale pH-Bereich liegt zwischen pH 7 und pH 7,5.

#### 4.1.4. Einfluß der Chitinkonzentration

Die Variation dieser nur für die Plattenversuche relevanten Größe wird von den methodischen Möglichkeiten eingeschränkt. Vor allem bei Ansätzen zur Oberflächenbeimpfung war es nicht möglich, höhere Chitinkonzentrationen einzusetzen, da ab 3 %iger Konzentration an kolloidalem Chitin der Deckschichtagar aufgrund seiner hohen Viskosität nicht gleichmäßig verteilt werden konnte. Beim Gußplattenverfahren war bei höheren Chitinkonzentrationen eine gleichmäßige Keimverteilung

nicht möglich und es kam zur Ausbildung schwer zählbarer Koloniehäufen neben größeren unbewachsenen Abschnitten.

Die Versuche haben gezeigt, daß die Zahl der zur Entwicklung kommenden Kolonien bei Verwendung von Chitinkonzentrationen über 0,6 % permanent abnimmt. Chitinkonzentrationen von weniger als 0,3 % führen zur Ausbildung von relativ großen und unscharfen Klärzonen, die eine eindeutige Keimzahlbestimmung erschweren. Die optimale Chitinkonzentration wurde mit 0,5 % ermittelt.

#### 4.1.5. Einfluß der Zählmethode

Von den methodischen Möglichkeiten her sind prinzipiell alle vier beschriebenen Zählverfahren anwendbar. Allgemein gilt, daß die Verdünnungsverfahren, besonders die MPN, aufwendiger sind als die Plattenverfahren, die letzteren aber mit chemisch vorbehandeltem Chitin angesetzt werden und somit nicht das am natürlichen Standort auftretende Substrat anbieten.

In Tabelle 2 sind die unter Anwendung verschiedener Zählverfahren erhaltenen Chitinabbauer einer Wasserprobe angegeben. Bei den Resultaten handelt es sich um die arithmetischen Mittelwerte aus 5 Parallelansätzen und um die zugehörigen Standardfehler ( $s_m$ ). Aus den Werten ist ersichtlich, daß die DRIGALSKI - und die Reihenverdünnungs- Methode nur hinsichtlich der Reproduzierbarkeit gute Ergebnisse liefern. Die Absolutwerte liegen jedoch deutlich niedriger als jene, die nach dem Gußplatten- bzw. nach dem MPN- Verfahren erhalten wurden. Es bieten sich also für die Zählung der chitinabbauenden Keime zunächst die beiden letztgenannten Verfahren an. Es wurde jedoch festgestellt, daß bei Überimpfung von auf Chitinplatten zur Entwicklung gekommenen Kolonien in Flüssigmedien (Chitinstreifenmedium) nur etwa 80 % dieser Kulturen anwachsen. Diese Tatsache weist aber

Tabelle 2

## Abhängigkeit der Zählergebnisse vom Zählverfahren

Vorverdünnung		0	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	MW Keime/ml	$s_m$ in %
Methode-Ansatz		Koloniezahl/Platte bzw. Anzahl der bewachsenen Röhrchen							
DRIGALSKI (0,05 ml)	1	27	6	-	-	-	-	792	15,2
	2	25	4	-	-	-	-		
	3	21	4	-	-	-	-		
	4	23	5	-	-	-	-		
	5	30	8	-	-	-	-		
PLATTEN- GUSS ( 1 ml )	1	-	57	16	-	-	-	1.073	17,1
	2	-	63	18	-	-	-		
	3	-	58	20	-	-	-		
	4	-	50	13	-	-	-		
	5	-	55	12	-	-	-		
REIHEN- VERD. (Doppelans.)	1	++	++	++	++	—	—	820	14,6
	2	++	++	++	++	—	—		
	3	++	++	++	++	—	—		
	4	++	++	++	++	—	—		
	5	++	++	++	++	—	—		
MPN	1	5	/5	5	4/	0	0	1.314	12,3
	2	5	5	/5	3	2/	0		
	3	5	5	/5	2	2/	0		
	4	5	5	/5	4	1/	0		
	5	5	/5	5	3/	0	0		

darauf hin, daß auf kolloidalen Chitinagarplatten auch Stämme erfaßt werden, die am Abbau von nativem Chitin nicht beteiligt sind.

Für die zahlenmäßige Erfassung von in Biotopen auftretenden chitinolytischen Bakterien scheint daher das MPN- Verfahren unter Verwendung eines Chitinstreifenmediums die aussagekräftigste Methode darzustellen.

#### 4.2. Isolierung und Kultivatio

Im Zuge der Arbeiten mit chitinabbauenden Bakterien traten in diesem Zusammenhang bedeutende Schwierigkeiten auf. Die zur Bakterienisolierung üblicherweise verwendeten Plattenverfahren brachten hier keine befriedigenden Ergebnisse. So waren einerseits einige, über Plattenansätze gewonnene Reinkulturen nicht in der Lage natives Chitin abzubauen, andererseits konnten nicht alle der isolierten chitinolytischen Stämme auch auf den entsprechenden Plattenansätzen gefunden werden. Zusätzlich zeigen die auf Chitinagar entwickelten Kulturen typische Unterscheidungsmerkmale nur in schwach ausgeprägter Form. Dies erschwert die gezielte Auswahl, so daß wiederholt idente Stämme isoliert wurden.

Günstigere Verhältnisse treten bei den Ansätzen mit Chitinstreifenmedium auf. Hier kommt ein Großteil der Kolonien bevorzugt auf dem aus der Flüssigkeit herausragenden Teil der Chitinstreifen zur Entwicklung und zwar unter deutlicher Ausbildung spezifischer Merkmale. So entwickelten sich Chromobakterien unter starker Blaufärbung des bewachsenen Chitinstreifens (der Farbstoff tritt später auch in die Flüssigkeit über). Pseudomonaden sind teilweise durch deutliche Fluoreszenz des Mediums erkennbar und Streptomyzeten werden von charakteristischem Erdgeruch begleitet. Dazu kommt die Tatsache, daß bei MPN- Ansätzen in den einzelnen

Röhrchen der höheren Verdünnungsstufen oftmals eine Species bevorzugt zur Entwicklung kommt. Dies ermöglicht eine rasche Isolierung der am Chitinabbau beteiligten Stämme, womit auch für diese Fragestellung die Verwendung von MPN-Ansätzen als optimale Lösung gefunden wurde.

Die einzelnen zu Reinkulturen führenden Schritte sind in Abbildung 2 in Form eines Arbeitsschemas dargestellt. Dabei wird im ersten Schritt aus den bewachsenen Röhrchen der höchsten Verdünnungsstufe Bakterienmaterial entnommen und auf Chitinagarplatten zu Einzelkolonien ausgestrichen. In der Regel genügen 2 Platten pro Röhrchen, wobei wenn möglich auf einer Platte Material von der Chitinstreifenoberfläche und auf der anderen Material aus der flüssigen Phase ausgestrichen wird. Die nach der Inkubation entwickelten Einzelkolonien werden über eine Zwischenpassage von Standard-I - Nährbouillon (MERCK Nr. 7882 ) geführt und anschließend durch nochmaliges Vereinzeln auf Standard - I - Nähragar (MERCK N. 7881) auf ihren Reinkulturcharakter geprüft. Nach Durchlaufen einer weiteren Zwischenpassage werden die Reinkulturen in Chitinstreifenmedium überimpft und auf ihre chitinabbauenden Fähigkeiten geprüft. Fällt dieser Bestätigungstest positiv aus, erfolgt als letzter Schritt die Übertragung auf Standard - I - Schrägagar (MERCK Nr.7881). Die Einschaltung von Zwischenpassagen in Flüssignährmedien wurde als notwendige Voraussetzung für die Erfassung auch der empfindlicheren Stämme gefunden. Nähere Erläuterungen dazu folgen im nächsten Abschnitt.

Die Stammhaltung gestaltete sich bei einigen der chitinolytischen Stämme äußerst schwierig. Die naheliegende Möglichkeit der Weiterkultivierung auf oder in Chitinnährmedien war für viele Stämme nicht möglich. Die bei SKERMAN (8) beschriebene Tatsache, daß mehrmalige Überimpfung in Chitinnährmedien bessere Wachstumseigenschaften der chitinolytischen Bakterien zur Folge hat, konnte durch unsere Untersuchungen nicht bestätigt

werden. Vielmehr wurde bereits nach 1 - 2 maliger Überimpfung bei einigen Stämmen schlechtes Anwachsen festgestellt und bei weiterer Verwendung des selektiven Chitinnährmediums waren diese Stämme nicht mehr kultivierbar. Durch Zwischenschaltung von Wachstumspassagen in flüssigen Kollektivnährmedien wie z.B. Standard I - Nährbouillon konnte dieser Effekt ausgeschaltet werden. Zusätzlich zu der eben beschriebenen Empfindlichkeit einiger Stämme gegenüber der permanenten Kultivierung im selektiven Chitinnährmedium wurde ein negativer Einfluß bei längerer Kultivierung auf festen Nährböden (auch bei Kollektivnährböden) festgestellt. Besonders Chromobakterien und einige Pseudomonaden zeigen nach mehrmaliger Überimpfung auf Schrägagar abnehmende Wachstumstendenz. In diesem Zusammenhang wurde weiters gefunden, daß Schrägagarkulturen dieser Gattungen in direktem Weg nur innerhalb einer Woche überimpft und kultiviert werden können. Werden die Kulturen länger gelagert, können sie nur nach einer Zwischenpassage in Nährbouillon wieder auf Schrägagar kultiviert werden.

Unter Anwendung des im Zuge dieser Untersuchungen erarbeiteten Arbeitsschemas für Isolierung und Kultivierung können die beschriebenen Schwierigkeiten ausgeschaltet werden. Dies ist insofern von großer Bedeutung als hier auch die genannten sensiblen Gattungen sicher erfaßt werden können, die einen beträchtlichen Anteil der gesamten am Chitinabbau beteiligten Populationen darstellen. Allgemein empfiehlt sich, die chitinolytischen Fähigkeiten der isolierten Kulturen in 6-Wochen Intervallen durch Übertragung in Chitinstreifenmedium zu überprüfen (siehe Abb.2).

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden Möglichkeiten zur Optimierung von Herstellung und Anwendung verschiedener Chitinnährmedien beschrieben und die Frage optimaler Wachstumsbedingungen chitinolytischer Bakterien behandelt. In diesem Zusammenhang wurde die günstigste Bebrütungs-temperatur mit 30 °C, der optimale pH-Bereich mit 7 - 7,5 sowie die für die Versuche am besten geeignete Chitin-konzentration mit 0,5 kolloidalem Chitin gefunden.

Vergleichende Untersuchungen zur zahlenmäßigen Erfassung der chitinolytischen Bakterien zeigten, daß nur die MPN-Methode ohne Einschränkungen anwendbar ist und die - vor allem in neueren Arbeiten beschriebene - quantitative Erfassung auf Chitinagarplatten keine befriedigenden Ergebnisse bringt, da hier auch Keime erfaßt werden, die nicht am Abbau von nativem Chitin beteiligt sind.

Für die Isolierung und Kultivierung von chitinolytischen Bakterien wird eine neue Methode beschrieben, die auch die Erfassung von sensiblen Stämmen, die einen beträchtlichen Anteil der zum Chitinabbau befähigten Gesamtpopulation stellen dürften, ermöglicht. Die Grundlage dieser Methode liegt im alternierenden Angebot von selektiven und kollektiven Nährböden in flüssiger und fester Form.

Literatur

- (1) BLUMENTHAL, H.J., ROSEMAN, S. (1957): Quantitative Estimation of Chitin in Fungi.-J.Bacteriol.,Vol.74,222-224.
- (2) CABIB, E., BOWERS, B.(1975): Timing and Function of Chitin Synthesis in Yeast.-J.Bacteriol., Vol.124 1586-1593.
- (3) HERTH, W., SCHNEPF, E. (1982): Chitin - Fibril Formation in Algae, in BROWN R. (ed) Cellulose and Other Natural Polymer Systems.- Plenum Press, New York, p.185.
- (4) WILLIAMS, S.T., ROBINSON, C.S. (1981): The Role of Streptomycetes in Decomposition of Chitin in Acidic Soils.-J.Gen.Microbiol.,Vol.127, 55-63.
- (5) OKAFOR,N. (1966): Ecology of Micro-Organisms on Chitin Buried in Soil.-J.Gen.Microbiol., Vol.44, 311-327.
- (6) WARNES, C.,RANGLES, C. (1977): Preliminary Studies on Chitin Decomposition in Lake Erie Sediments.- Ohio J. Sci., Vol.77, 224.
- (7) WARNES, C., RANGLES, C. (1980): Succession in a Microbial Community associated with Chitin in Lake Erie Sediment and Water.- Ohio J.Sci., Vol.80, 250.
- (8) SKERMAN, V.B.D.(1967): The Genera of Bacteria.- The Williams & Wilkins Comp., Baltimore, sec.ed. 254.
- (9) MERCK (1980): Handbuch Nährböden MERCK, 193.
- (10) OBERZILL, W. (1967): Mikrobiologische Analytik.- Verlag Hans Carl, Nürnberg.

Anschrift des Verfassers:Mag.rer.nat.Dipl.-Ing.Dr.techn.Franz STREICHSBIER,  
 Institut für Biochem.Technologie und Mikrobiologie, Technische Uni-  
 versität Wien, Getreidemarkt 9, A-1060 W i e n

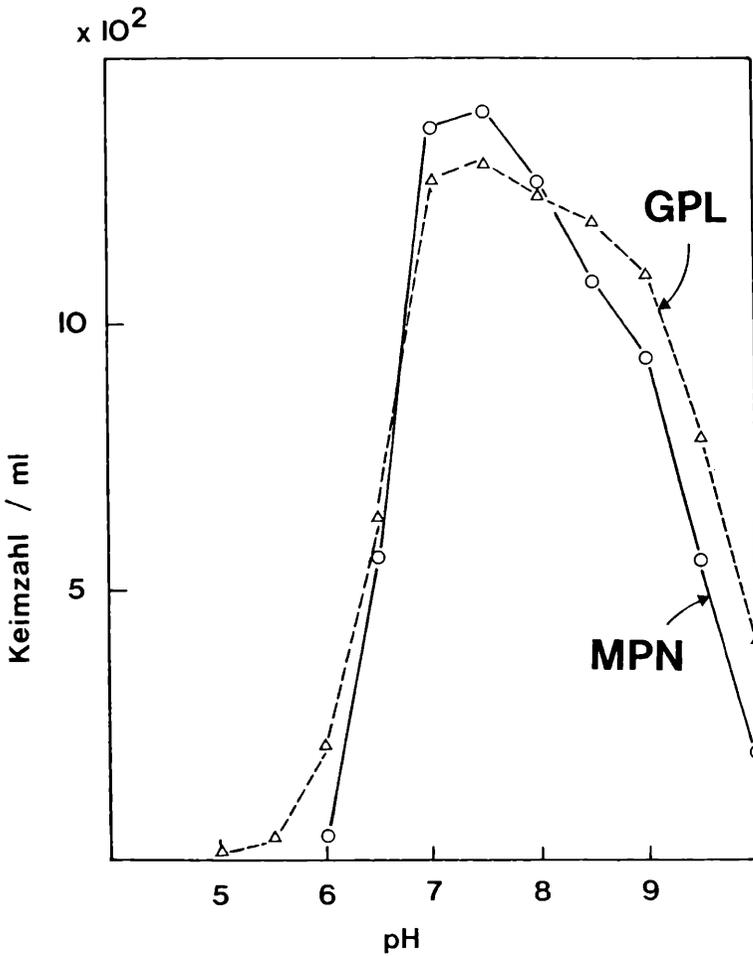
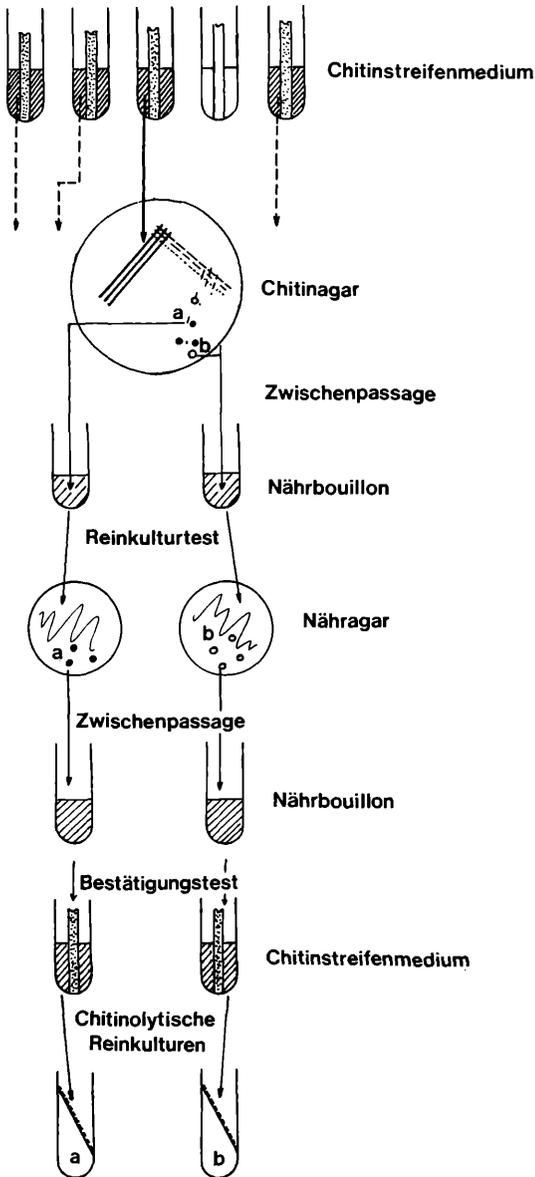
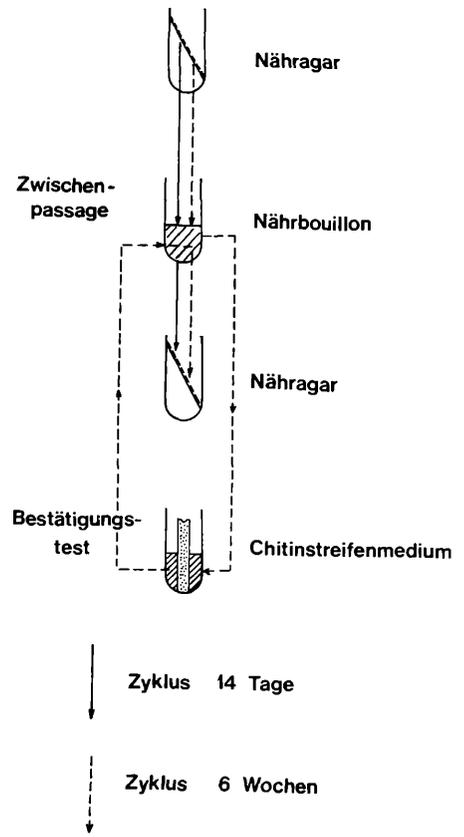


Abbildung 1 Einfluß des pH - Wertes auf die zahlenmäßige Erfassung chitinolytischer Bakterien mittels Gußplattenverfahren ( GPL ) und most propable numbers ( MPN ).

# ISOLIERUNG



# STAMMHALTUNG



# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Wasser und Abwasser](#)

Jahr/Year: 1982

Band/Volume: [1982](#)

Autor(en)/Author(s): Streichsbier F.

Artikel/Article: [Neue Methoden zur Isolierung chitinabbauender Bakterien 12-30](#)