

Diss. ETH 5405

**Metabolische Studien der Temperaturadaptation  
bei *Bacillus Stearotherophilus***

ABHANDLUNG

zur Erlangung

des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN  
HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

**LORENZ JUNG**

Dipl. Natw. ETH Zürich

geboren am 14. Dezember 1943

von Küsnacht und Basel

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. H. Zuber, Referent

Prof. Dr. A. Fiechter, Korreferent

aku-Fotodruck

Zürich

1974

## ZUSAMMENFASSUNG

*Bacillus stearothermophilus* NCIB 8924 / ATCC 7954 benötigt für ein gutes Wachstum ausserordentlich komplexe Medien, wie z.B. Trypton-Fleischextrakte. Es werden bei Pufferung auf pH 7 maximale Zelltitert von  $1.4 \times 10^9$  Z/ml erreicht.

Soll dieser *Bacillus* bei Temperaturen unterhalb  $45^{\circ}\text{C}$  zum Wachsen gebracht werden, so tritt ein Kümmerwachstum ein. Um Uebergänge von thermophilen auf mesophile Temperaturen zu ermöglichen, ist die Einschaltung einer Kultivierung bei der Zwischentemperatur  $47^{\circ}\text{C}$  erforderlich, um dadurch den Organismus an die neuen Bedingungen zu adaptieren. Zellen aus  $47^{\circ}\text{C}$ -Kulturen sind sehr stabil gegen plötzliche Erhöhung der Züchtungstemperatur. Diese Thermoadaptation von thermophilen Bakterien auf mesophile Kulturtemperaturen ist mediumabhängig und funktioniert nur auf Brain-Heart-Infusion, Weizengriesstryptonmedium oder Cystein-Trypticase-Agar.

Auf diese Art können auch sog. "obligat"- thermophile Bacillen mesophil gezüchtet werden, was auf die Sinnlosigkeit der Begriffe "obligat"- und "fakultativ"- thermophil hinweist.

Bei den beiden Züchtungstemperaturen tritt ein Koloniedimorphismus auf, d.h. bei  $55^{\circ}\text{C}$  sind die Zellkolonien klein und glatt, aber bei  $37^{\circ}\text{C}$  gross und rauh. Die  $55^{\circ}\text{C}$ -Organismen sind fakultativ anaerob, die  $37^{\circ}\text{C}$ -Organismen obligat aerob. Die Kolonieförmigkeiten (rauh/glatt) sind nicht von der Anwesenheit von Sauerstoff, sondern nur von der Temperatur abhängig.

Die  $37^{\circ}\text{C}$ -Zellen sind sehr beweglich, besonders auf ärmeren Medien, während  $55^{\circ}\text{C}$ -Zellen nur schwach beweglich sind. Die Sporulation bei beiden Temperaturen verläuft identisch und liefert die typischen terminal angeordneten ovalen Endosporen. Die maximalen spezifischen Wachstumsraten  $\mu_{\max}$  betragen bei beiden Temperaturen ca. 1.5 auf Brain-Heart-Infusion. Derselbe Wert wird auch bei den  $55^{\circ}\text{C}$ -Zellen unter anaeroben Bedingungen gefunden, während er dann bei  $37^{\circ}\text{C}$  äusserst tief liegt.  $\mu_{\max}$  ist mediumabhängig. Unterschiede in den taxonomischen Kriterien

zwischen den beiden Temperaturformen treten nur bei der Citratverwertung und der Voges-Proskauer-Reaktion auf.

Zelluläre Extrakte aus *B. stearothermophilus* zeigen beachtenswerte Unterschiede in den Aktivitätsspiegeln verschiedener Enzyme, je nach Wachstumstemperatur. So werden bei 55°C-Kulturen hohe Alcohol-, Glycerinaldehyd-3-P-, Lactat- und Malat-Dehydrogenase-Aktivitäten gemessen. Die entsprechende Anaerobkultur zeigt etwa diesselben Werte. Bei 37°C-Kulturen werden keine Alcohol-, dafür mehr Isocitrat- und Succinat-Dehydrogenase gefunden und ausserdem wird bei dieser Temperatur in grösserer Menge Acetoin ins Medium abgegeben. Der Respirationsquotient bleibt für 37°C-Zellen stets im respirativen Bereich unter 1.0. Bei 55°C-Zellen hingegen steigt er in einer zweiten Wachstumsphase auf Werte über 1.0, was auf einen fermentativen Metabolismus hinweist. Bei der hohen Züchtungstemperatur werden saure Endprodukte wie Pyruvat, Lactat und ausserdem Aethanol von den Zellen ausgeschieden. Bei der 37°C-Kultivierung hingegen wird vorhandenes Lactat aufgebraucht, ebenso verschwindet gebildetes Pyruvat und Acetoin bei fortgeschrittenem Zellalter. Kohlenstoffsummenbilanzen zeigen ausser der Benutzung von Glucose die anschliessende Verwertung von im Medium enthaltenen Aminosäuren.

Kulturen bei der Zwischentemperatur 47°C nehmen auch in Bezug auf die genannten Unterschiede eine Zwischenstellung ein.

Unter den besonders hervortretenden Enzymen wird die Lactat-DH sowohl bei 55°C wie 37°C am Ende der logarithmischen Wachstumsphase maximal gebildet. Das Enzym aus 55°C-Zellen ist thermostabil, während es in 37°C-Zellen thermolabil vorliegt. Eine Hitzebehandlung bewirkt eine Aktivierung des thermostabilen Enzyms. Die Alcohol-DH wird nur bei 55°C gebildet und besitzt ähnliche Thermostabilität wie die Lactat-DH. Das Auftreten der Alcohol-DH bei steigender Züchtungstemperatur legt das Thermoadaptationsintervall auf 45°-50°C fest. Die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus den thermophilen Kulturen besitzt eine geringe Thermostabilität.

Die Aminopeptidase I ist thermostabil bis 80°C. Ganze Zellen zeigen nach aussen Enzymaktivität, die durch Lipidextraktion der Zellwand

weiter erhöht wird. Das Enzym ist zu 20-45% in den Zellmembranen lokalisiert, der Rest wird im Cytoplasma gefunden. Succinat-DH und ATPase sind zu 100% membrangebunden. Amino-peptidase II tritt hauptsächlich im Cytoplasma gelöst auf.

Die Amino-peptidase I aus 37°C - und 55°C-Zellen ist identisch in Bezug auf Gelfiltration, Elektrophorese, Thermostabilität, Aktivierbarkeit durch  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen und Substratspezifität. Dieses Enzym kann als brauchbares Kriterium für den Nachweis der Speciesidentität von *Bacillus stearothermophilus*, gezüchtet bei 55°C und 37°C, herangezogen werden.