Nematoden und Bakterien in obligater Symbiose

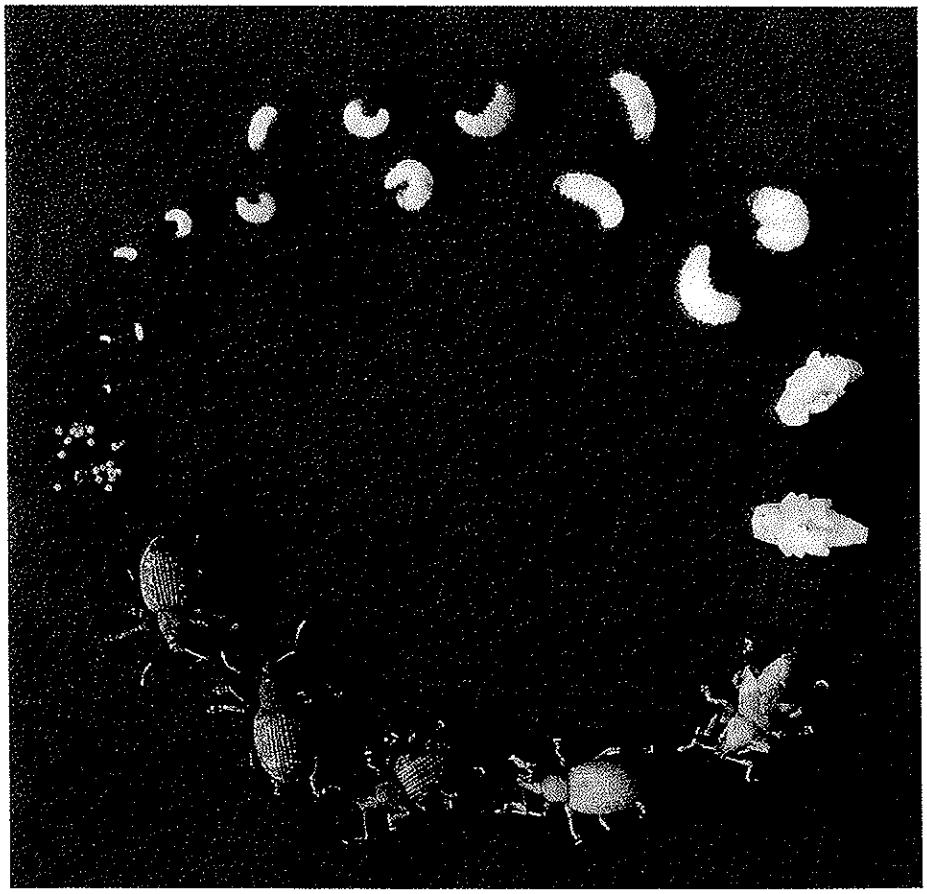
Jürg M. GRUNDER, Eidgenössische Forschungsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau (FAW), CH-8820 Wädenswil

Im Rahmen der biologischen Bekämpfung des Dickmaulrüsslers mit insektenpathogenen Nematoden wurden die Zusammenhänge der Lebensgemeinschaft von Nematoden (Aelchen) und Bakterien untersucht. Die Wirkung insektenpathogener Nematoden übertrifft in vielen Fällen die Resultate, welche mit chemischen Wirkstoffen erreicht werden. Zu den Wirtsinsekten dieser Nematoden gehören Vertreter aus den Ordnungen der Käfer, Fliegen, Schmetterlinge und Hautflügler. Durch Isolationen weiterer Nematodenstämme aus dem Boden und aus Insekten werden immer wieder Einsatzmöglichkeiten gefunden.

Abb. 2. Infektive Nematodenlarven in einer Wassersuspension. Die Länge der Nematoden beträgt ca. 750 µm. ▶

In der Schweiz sind seit 1985 Produkte mit insektenpathogenen Nematoden auf dem Markt erhältlich. Das Hauptsegment der Kunden stammt aus dem privaten Gartensektor (Grunder 1994). Zunehmend werden diese Produkte jedoch auch im landwirtschaftlichen Bereich eingesetzt (Friedmann 1990). Die wichtigsten zu bekämpfenden Insekten sind Käferlarven der Gattung *Otiorhynchus* (Abb. 1) sowie Larven der Trauermücken (*Sciaridae*). Aufgrund ihrer Robustheit lassen sich insektenparasitische Nematoden mit den praxisüblichen Spritzgeräten, zum Beispiel mit Rücken- oder Motorspritzen (bis 5 bar Druck), oder mit bestehenden Bewässerungsanlagen ausbringen. Auf kleinen Flächen ist die homogene Verteilung der Nematoden-Wasser-Suspension mit einer Brause der Giesskanne zu empfehlen.

Abb. 1. Die larvale Entwicklung des Gefurchten Dickmaulrüsslers (*Otiorhynchus sulcatus*) durchläuft nach dem Schlüpfen aus den Eiern sechs Larvenstadien bis zur Verpuppung, welche alle von Nematoden befallen werden können. Die adulten Käferstadien verursachen vor allem einen visuellen Kerbenfrass an den Blättern der Pflanzen. ▼



Biologische Zusammenhänge

Das im Boden freilebende Stadium der Nematoden (Abb. 2) sucht mittels chemischer und physikalischer Gradienten die Insektenwirte auf, dringt bis in die Hämolymphe der Insekten ein und setzt Zellen der symbiontischen Bakterien *Photorhabdus luminescens* aus dem Verdauungstrakt des Nematoden frei. Die Vermehrung dieser Bakterien tötet das Wirtsinsekt und bietet den Nematoden die Voraussetzung für die Bildung einer neuen Generation von Nematodenlarven. Diese verlassen nach Abschluss des Vermehrungszyklus den Insektenkadaver, um im umliegenden Boden nach weiteren Wirtsinsekten zu suchen. Die aus dem Insekt

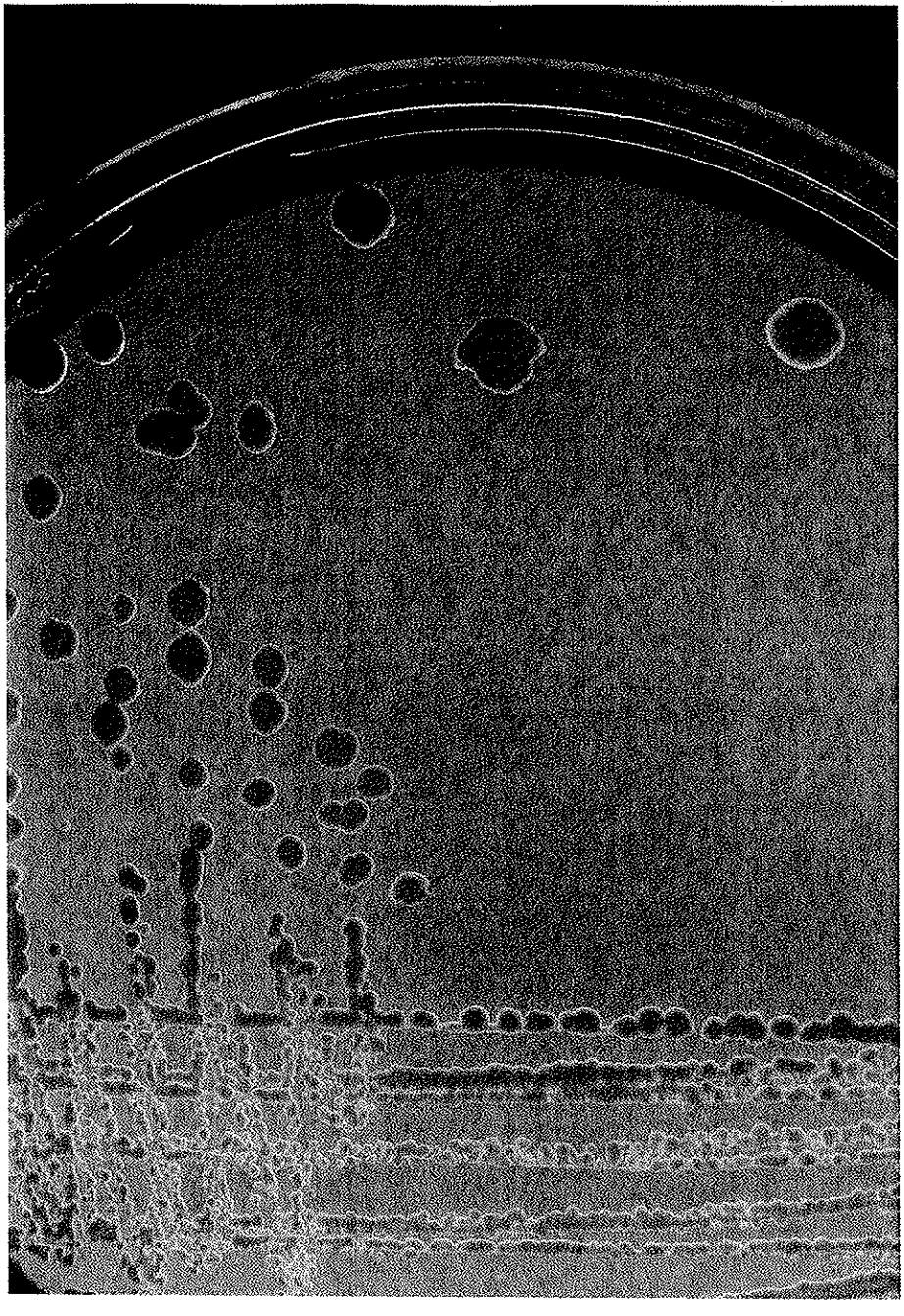
ausschwärmenden Nematoden enthalten in ihrem Intestinaltrakt wiederum die symbiontischen Bakterien.
Unter künstlichen Bedingungen der Bakterienvermehrung kann sporadisch die Formvariante SW79 auftreten. Sie führt zur Störung der Symbiose. Eine Folge davon ist, dass die Massenvermehrung der Nematoden zusammenbricht. Mit dem Phasenwechsel scheinen grundlegende symbiontische Funktionen verloren zu gehen (Grunder und Lüthy 1994). Die Untersuchung der Funktionen des natürlichen Mikrosymbionten und seiner Formvariante und deren Einfluss auf die Symbiose mit den Nematoden war das zentrale Thema dieser Studie.

Symbiontische Organismen

Hauptsächlich wurde mit einem Nematodenstamm der NW-europäischen Gruppe der Art *Heterorhabditis megidis* mit der Bezeichnung CH-HW79 gearbeitet (Klingler 1988; Smits *et al.* 1991). Das Bakterium *Photorhabdus luminescens* PW79 wurde aus den Nematoden isoliert. Aus dem Bakterienisolat konnte die Formvariante mit den Bezeichnungen SW79 gewonnen werden. *Photorhabdus* wird als gram-negatives, fakultativ anaerobes, lumineszierendes und nicht sporulierendes Bakterium beschrieben (Boemare *et al.* 1993). Die Zellen sind stäbchenförmig und 2 bis 10 µm lang und 0,5 bis 2 µm breit. Im Extremfall können Zellängen bis 30 µm auftreten. Die Zellen sind beweglich und begeisselt.

Charakterisierung der Mikrosymbionten

Der natürliche Mikrosymbiont und seine Formvariante wurden mit bakteriologischen, molekularbiologischen und biochemischen Methoden charakterisiert. Zur Differenzierung der beiden Bakterienformen konnten unter anderen Merkmalen die Pigmentierung (Abb. 3a, b), die antibiotische Wirkung gegenüber verschiedenen Indikatorbakterien (Abb. 4a, b), das Wachstumsverhalten bei 25°C, das Vorkommen von kristallinen Einschlüssen (Abb. 5), die Biolumineszenz sowie Unterschiede in biochemischen Reaktionen herangezogen werden. Durch Längenmessungen konnten die Zellen von *P. luminescens* und seiner Formvariante als Population statistisch gesichert unterschieden werden. Es war jedoch nicht möglich, individuelle Zellen mittels mor-



Glossar

Biolumineszenz	Auf biochemischen Vorgängen beruhende Lichtausstrahlung vieler Lebewesen (Bakterien, Tiefseefische u.a.)
Hämolymphe	Blutflüssigkeit wirbelloser Tiere mit offenem Blutgefässystem
Kutikula	Dünnes Häutchen über der äusseren Zellschicht bei Pflanzen und Tieren
Inokulation	Impfung von Bakterien in ein Medium zur Auf- und Weiterzucht
Insektenpathogen	Krankheiten-verursachend bei Insekten
Intestinaltrakt	Gesamtsystem des Verdauungskanal eines Organismus
Mikrosymbiont	Pflanze oder Tier, das mit anderen in Symbiose lebt (in unserem Fall sind es Bakterien)
Pathogenität	Fähigkeit, Eigenschaft bestimmter Substanzen und Organismen, Krankhafte oder letale Veränderungen im Organismus hervorzurufen
Symbiose	Zusammenleben von Lebewesen verschiedener Art zu gegenseitigem Nutzen

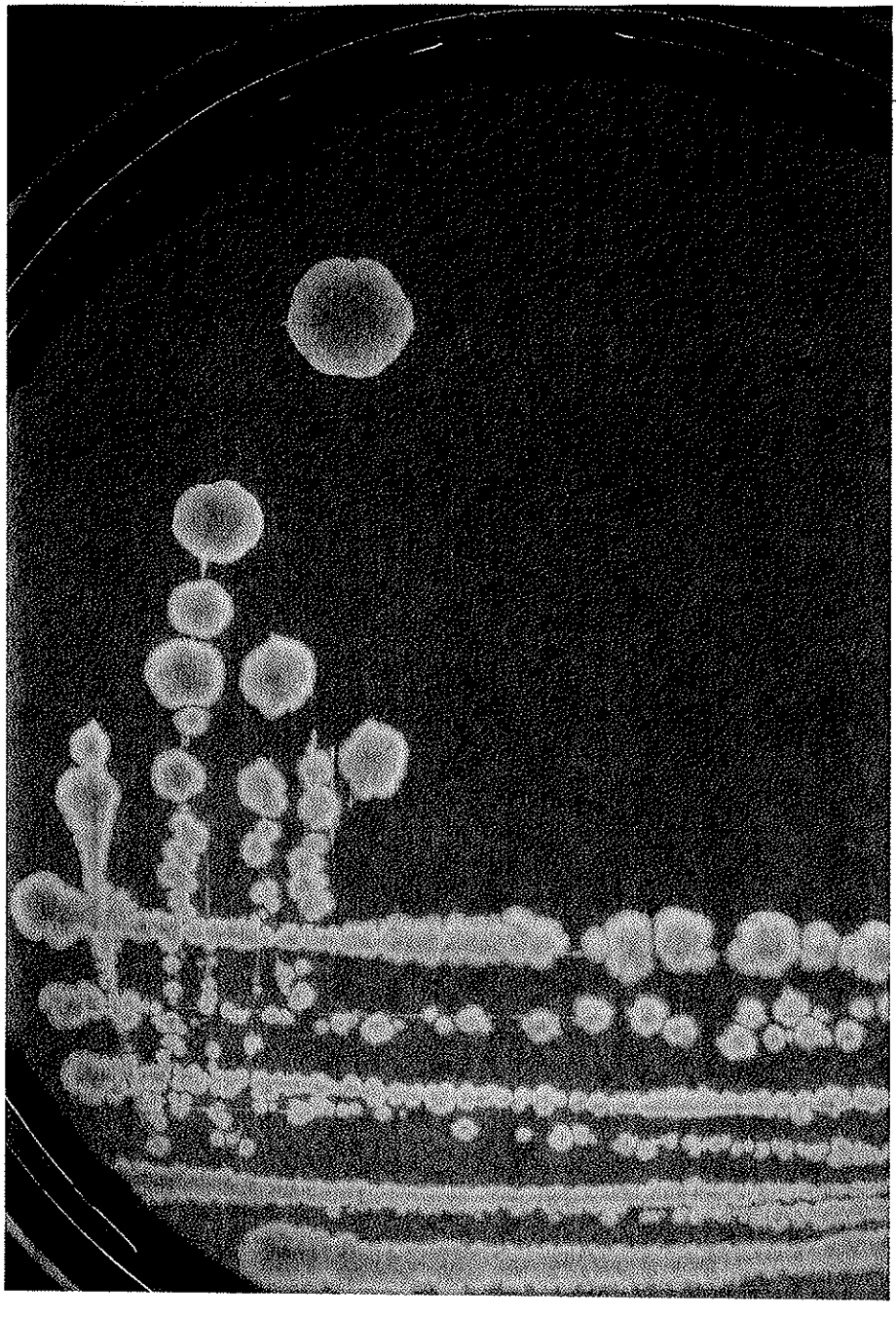


Abb. 3a. Die Ausstriche von *P. luminescens* PW79 auf MacConkey-Agar sind dunkelrot gefärbt. ◄◄

Abb. 3b. Die Formvariante SW79 nimmt das Neutralrot des MacConkey-Agars nicht auf und bildet ein gelbes Pigment. ◄

phologischer Messungen einer der beiden Formen zuzuordnen. Weiter unterschieden sich die Bakterienformen in der Konsistenz der Zellmasse und damit in der Morphologie der Koloniebildung auf Agarmedien. In der Pathogenität gegenüber von Insektenlarven differierten die Bakterienformen nicht, jedoch unterstützte die Formvariante die Nematodenvermehrung nicht mehr.

Anzahl und Verteilung der Mikrosymbionten

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden Präparate mit Nematoden und Bakterien aus *in vitro*- und *in vivo*-Kulturen hergestellt. Die Organismen wurden im Labor für Elektronenmikroskopie an der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich gemäss der Methode von Hohenberg *et al.* 1994 und Hermann *et al.* 1994 präpariert.

Die quantitative Erfassung der Bakterienzellen im Intestinaltrakt der Nematoden wurde mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen durchgeführt. Fotoserien mit Längs- und Querschnitten auf der gesamten Länge des Nematoden ergaben ein Bild über die Verteilung der Bakterien im Intestinaltrakt. Repräsentative Beispiele sind in Abbildungen 6 und 7 dargestellt. Die berechneten Dimensionen der drei Abschnitte des Darmtraktes basierten auf dem Mittel von 25 im Lichtmikroskop ausgemessenen Nematoden (Abb. 8).

In allen drei Teilen des Nematodendarmes wurden die vorhandenen Bakterienzellen in den entsprechenden Querschnitten der elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfasst und aufgrund der Verteilung in den Längsschnitten auf die insgesamt vorhandene Zellzahl hochgerechnet. Die Auszählung der Bakterienzellen aus den Fotoserien der Längs- und Querschnitte durch die Nematoden ergab für das erste Teilstück des Darmtraktes 2'140 Bakterienzellen, für das mittlere Teilstück 607 Bakterienzellen. Im letzten Abschnitt des Intestinaltraktes konnten keine Zellen gefunden werden. Mit diesen elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Längs- und Querschnitten durch den Intestinaltrakt des Nematoden konnten durchschnittlich 2'700 Bakterienzellen pro Nematode gezählt werden.

Immunologische Untersuchungen

Zur direkten Identifikation von natürlichen Mikroysymbionten (*P. luminescens*) und dessen Formvariante wurden spezifische Antiseren entwickelt. Anschliessend wurde eine Goldmarkierung der Epitope, spezifische Bindestellen von Antigenen und Antikörpern, auf der zu identifizierenden Zelloberfläche durchgeführt. Die kolloidalen Goldpartikel (Durchmesser = 10 nm) erzeugen im Elektronenstrahl ein spezifisches Signal und sind als elektronendichter, dunkler Punkt auf den Aufzeichnungen im Elektronenmikroskop erkennbar. In der vorliegenden Arbeit gelang es erstmals, die Bakterien direkt im Intestinaltrakt der Nematoden als *P. luminescens* darzustellen. Die Verwendung der Antiseren ermöglichte es, die Bakterien *in situ* zu identifizieren. Bisher konnte nur ein indirekter Nachweis durch Isolation der symbiotischen Bakterien und anschliessender Vermehrung *in vitro*-Kulturen auf bestimmten Testmedien durchgeführt werden. Eigene Beobachtungen zeigten jedoch, dass bereits die wiederholte Kultivierung von *P. luminescens* auf künstlichen Medien den Phasenwechsel zu der Formvariante einleiten kann.

Aufgrund der Goldmarkierungen der Bakterienzellen konnte die Formvariante als Mikrosymbiont im Nematoden ausgeschlossen werden. Die Arbeitshypothese,

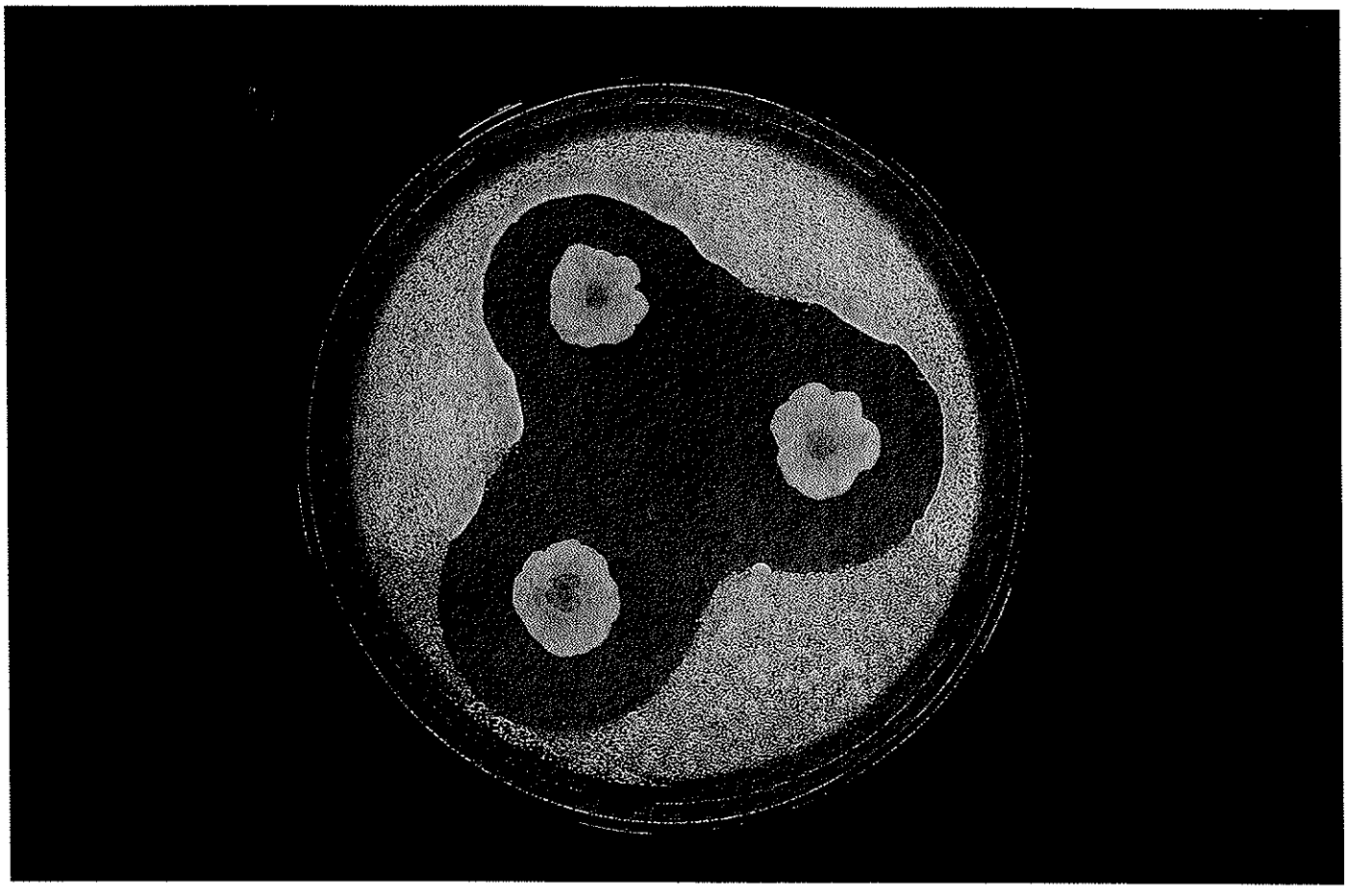


Abb. 4a. Kolonien von *P. luminescens* PW79 zeigen deutliche Hemmhöfe gegen die Indikatorbakterien (*M. luteus*). ▲

Abb. 4b. Die Formvariante SW79 wird von Indikatorbakterien (*M.luteus*) überwachsen. Die leichte Dispergierbarkeit der Zellen verursachte die Trübung rund um die Kolonien. ▼

dass die Formvariante eine Dauerform der symbiotischen Bakterien im Nematoden darstellt, konnte mit diesen Experimenten widerlegt werden.

Mikrosymbionten im Zyklus der Nematoden

Die Gesamtheit der Resultate ermöglichte es, den Lebenszyklus von Nematoden und den symbiontischen Bakterien darzustellen. Die Abbildung 9 zeigt schematisch den Lebenszyklus von *P. luminescens* im Zusammenhang mit den Nematoden und dem Insektenwirt. Der Nematode bietet den Zellen von *P. luminescens* Schutz und Transport bis in die Hämolymphe eines Wirtinsektes (Abb. 9/Pos. 1+2). Mit dem sklerotinisierten Zahn kann das infektive Nematodenstadium direkt durch die Kutikula in das Insekt eindringen (Abb. 10).

Das Zusammenwirken der Bakterien und der Nematoden führt zum Tod des Insektes. Während des Infektionsvorganges ist die Temperatur entscheidend für die Vermehrung der Bakterien in der Hämolymphe des Insektes (Abb. 9/Pos. 3+4). Versuche von Grunder (1985) zeigten eine erhöhte Mortalität der Wirtsinsekten bei Bodentemperaturen über 12°C, welche auf die Wachstumsgeschwindigkeit von *P. luminescens* zurückzuführen war.

Die Vermehrung der Bakterien zeigt sich in der intensiven Rotverfärbung der befallenen Larven (Abb. 11). Die von den Bakterien während der späten exponentiellen und der stationären Wachstumsphase produzierte Biolumineszenz weist vermutlich weitere Bodenlebewesen ab, in den Insektenkörper einzudringen (Abb. 9/Pos. 5). Zusätzlich verhindert die Produktion antibiotischer Wirkstoffe das Eindringen und die Besiedlung des Insektenkörpers durch andere Mikroorganismen.

Die Vermehrung von *P. luminescens* und der Abbau der Insektenhämolymphe sind Voraussetzung für die Entwicklung und die Vermehrung der Nematoden (Abb. 9/Pos. 6). Am Ende des Vermehrungszyklus der Nematoden hatte jede infektive Dauerlarve durchschnittlich 2'700 Zellen von *P. luminescens* in ihren Intestinaltrakt aufgenommen (Abb. 9/Pos. 7). Die Nematoden verlassen den Insektenkadaver und suchen im Boden nach neuen Wirtsinsekten (Abb. 9/Pos. 8). Bis zur erneuten Freilassung verbleiben die Bakterienzellen in einer Überdauerungsphase im Darmtrakt des Nematoden.

Die im Insektenkadaver verbliebenen Bakterienzellen haben nun keine biologi-

Abb. 5. Die Zellen von *P. luminescens* PW79 zeigen deutlich den für gram-negative Bakterien typischen Zellwandaufbau mit einer Zellwand (Z) und einer Cytoplasmamembran (CM). In einem Teil der Zellen von *P. luminescens* sind grosse kristalline Einschlüsse (K) zu erkennen.

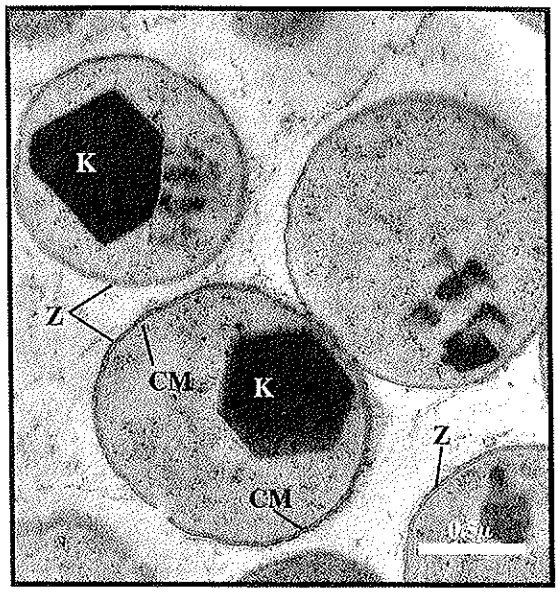


Abb. 6. Der Querschnitt durch den vorderen Teil des Nematoden zeigt mehrere Muskelstränge (M), die gerippte äussere Kutikula (K2) des J2d-Stadiums und die Kutikula (K) der Dauerlarve mit zwei seitlichen Längslinien (LL). Klar erkennbar sind die Bakterienzellen von *P. luminescens* (Pl) im Darmlumen sowie die Fettreserven (Fettvakuolen: F) und die Proteinkörper (P) des Nematoden.

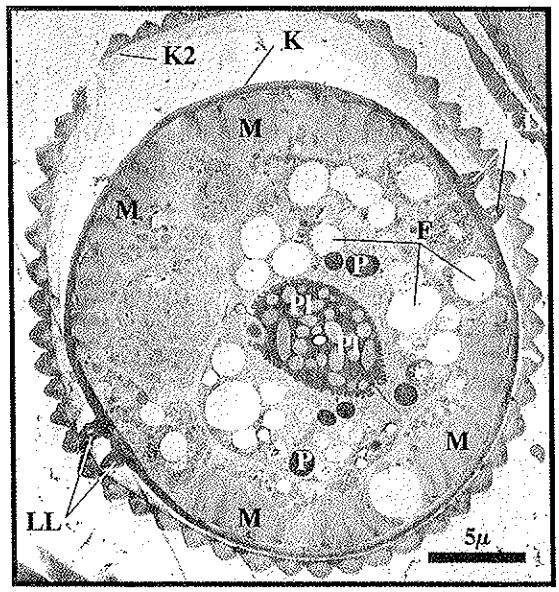
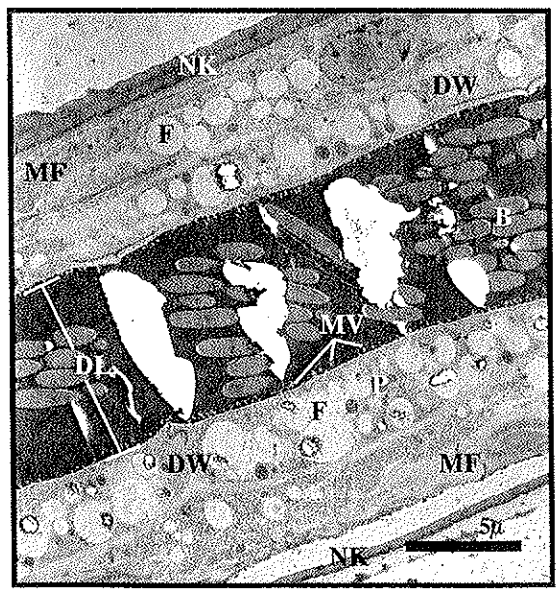


Abb. 7. Längsschnitt durch den vordersten Teil des Intestinaltraktes eines Nematoden (DL) nach 20 Tagen Lagerungszeit. Deutlich sind die Zellen von *P. luminescens* im Darmlumen des Nematoden zu erkennen.



Legende zu Abbildungen 5 bis 7 und 10: Pl = Zellen von *P. luminescens*, SZ = Sklerotinisierter Zahn, DW = Darmwand, DL = Darmlumen, DM = Darmzellenmembran, NK = Nematodenkutikula, LL = Längslinien, MV = Mikrovilli-Fortsätze, MF = Muskelfasern, F = Fettvakuolen, P = Proteinkörper, CM = Cytoplasmamembran, Z = Zellwand, K = Kristalline Einschlüsse

sche Funktion mehr, welche das Überleben der Nematoden als Symbiosepartner beeinflussen könnte. Mit dem Abschluss der Nematodenvermehrung und der Aufnahme der Bakterien in den Intestinaltrakt der Nematoden schliesst sich der Lebenszyklus der Symbionten. Die Formvariante konnte erst nach dem Verlassen der Nematoden im Insekt isoliert werden (Abb. 9/Pos. 9). Mit der nachlassenden Aktivität der antibiotischen Wirkstoffe werden Mikroorganismen aus dem umgebenden Boden den Insektenkadaver besiedeln und zersetzen (Abb. 9/Pos. 10). Die Formvariante konnte bisher noch nicht frei im Boden nachgewiesen werden. Im Lebenszyklus mit den Nematoden konnte ihr keine essentielle Aufgabe zugeordnet werden. Sie war nicht in der Lage die Funktion als Mikrosymbiont der Nematoden auszuüben. Im Gegenteil, die Nematodenvermehrung wurde im Beisein der Formvariante blockiert.

Schlussbemerkungen

Die vorliegende Arbeit leistete neben den wissenschaftlichen Resultaten auch einen Beitrag zur Verbesserung der *in vitro*-Produktion insektenpathogener Nematoden auf festem Medium. Kostspielige Misserfolge durch den Verlust von Produktionseinheiten, indem anstelle von *P. luminescens* die Formvariante verwendet wurde, lassen sich in Zukunft vermeiden. Es konnte gezeigt werden, dass lebende Zellen von *P. luminescens* für die Vermehrung der Nematoden unerlässlich sind. Die Inokulation der Formvariante in ein Produktionsmedium verunmöglichte die Vermehrung der Nematoden. Sobald die Bakterienpopulation keiner Reinkultur von *P. luminescens* mehr entsprach, verminderte sich der Ertrag an Nematoden. Jeder neue Ansatz einer Produktionseinheit muss demnach mit einer geprüften Stammkultur beimpft werden. Damit lässt sich eine Sammlung an optimierten und kontrollierten Kulturen mit *P. luminescens* aufbauen, um bei einem Zusammenbruch der Vermehrungsraten sofort mit einer neu angesetzten Stammkultur weiter arbeiten zu können. Die Zuverlässigkeit, in der industriellen Produktion hohe Vermehrungsraten zu erreichen, ist für die Produzenten von ausschlaggebender Bedeutung und trägt letzlich dazu bei, dass diese Methode der biologischen Schädlingsbekämpfung in der Landwirtschaft, in Baumschulen, Gärtnereien, sowie im privaten Gartenbereich vermehrt eingesetzt werden kann.

LITERATUR

Boemare N.E., Akhurst R.J. and Mourant R.G., 1993. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae) symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus *Photorhabdus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 2, 249-255.

Friedmann M., 1990. Commercial production and development. In: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. Gaugler R. & Kaya H.K., Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 153-170.

Grunder J.M. and Lüthy P., 1994. On the role of the bacterium *Xenorhabdus luminescens*, the microsymbiont of the nematode CH-HW79. *IOBC WPRS Bulletin* **17**, 3, 86-90.

Grunder J.M., 1985. Untersuchungen über die Bekämpfung der Larven des Dickmaulrüsslers (*Otiorhynchus sulcatus* F.) mit zooparasitischen Nematoden. Diplomarbeit, ETH Zürich, Institut für Phytomedizin, 76 S.

Grunder J.M., 1994. Biologische Kontrolle von Schadinsekten. *Gartenbau* **15**, 20-22.

Grunder J.M., 1997. *Photorhabdus luminescens* als Symbiont insektenpathogener Nematoden. Dissertation Nr. 11952, ETH Zürich, 131.

Hermann R., Hohenberg H., Grunder J. und Müller M., 1994. Gefroren-hydratisierte Suspensionen in TEM und REM. *Europ. J. Cell Biol.* **61**, 3-6.

Hohenberg H., Mannweiler K. and Müller M., 1994. High-pressure freezing of cell suspensions in cellulary tubes. *J. Microscopy* **175**, 1, 34-43.

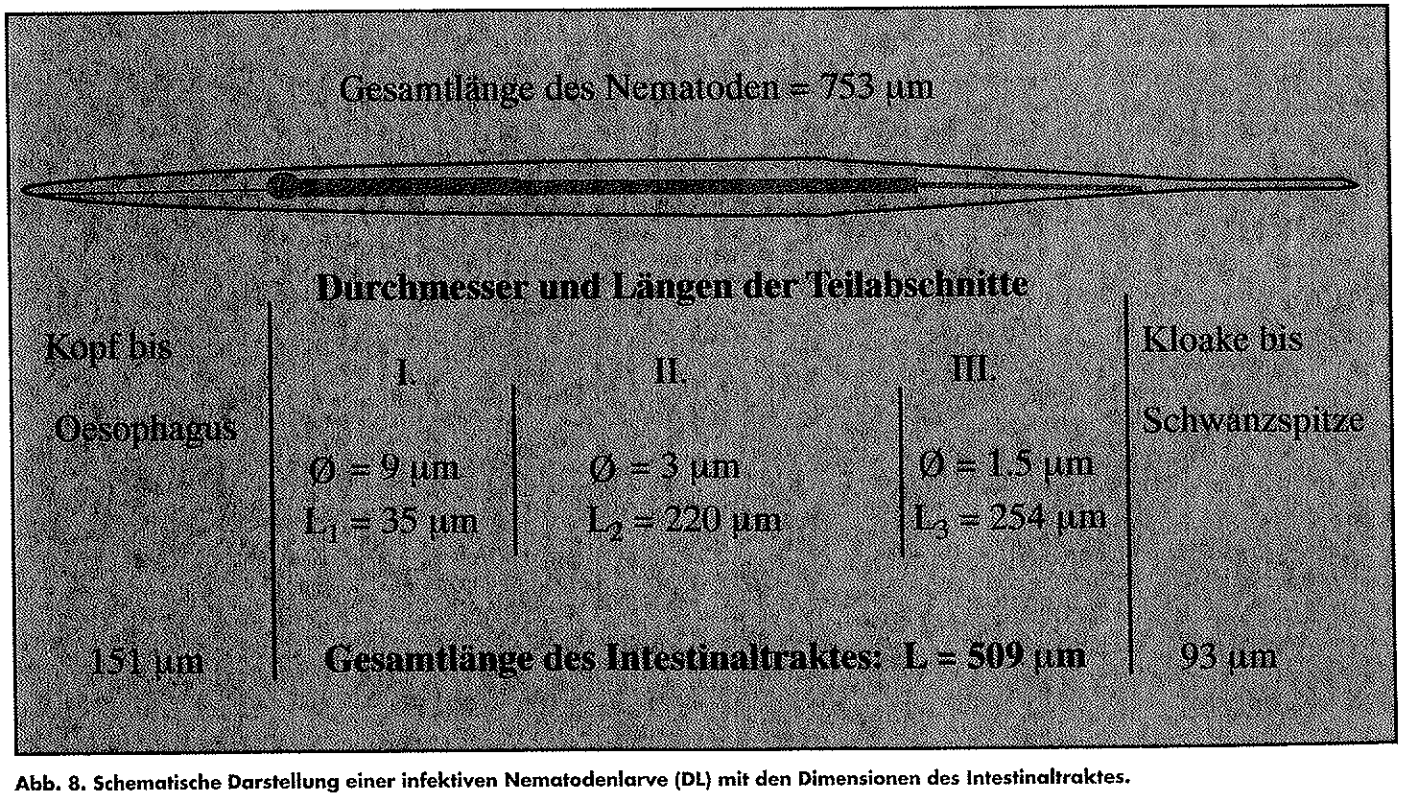


Abb. 8. Schematische Darstellung einer infektiven Nematodenlarve (DL) mit den Dimensionen des Intestinaltraktes.

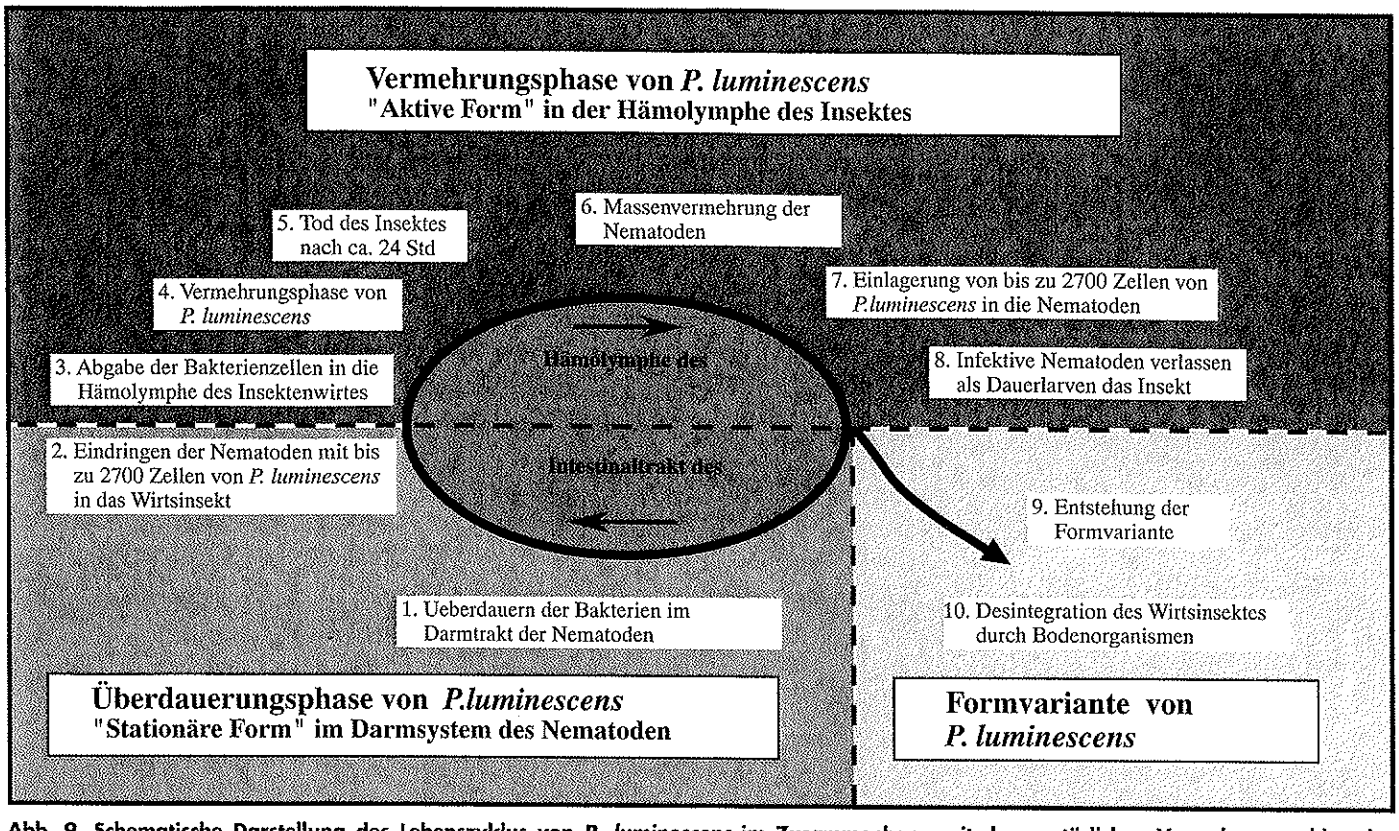
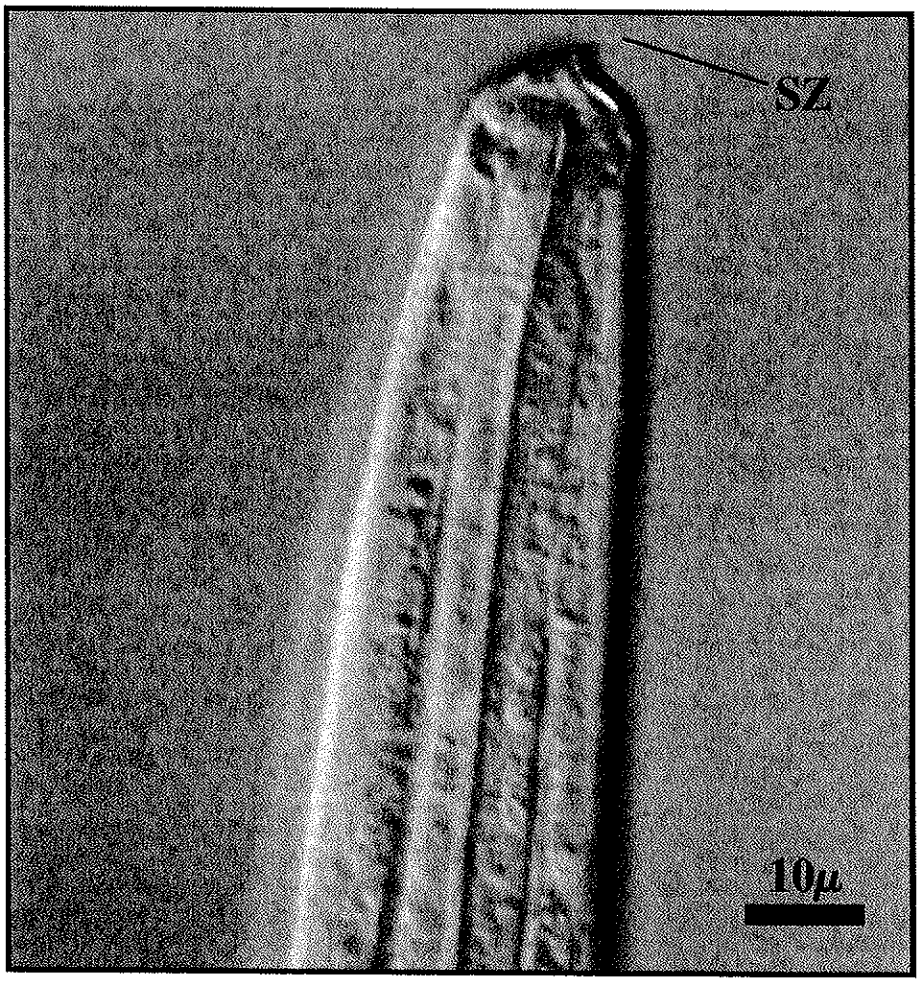


Abb. 9. Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *P. luminescens* im Zusammenhang mit dem natürlichen Vermehrungszyklus der Nematoden in Insektenlarven.

Abb. 10. Die Kopfpartie des freilebenden Nematodenstadiums (Dauerlarve) zeigt einen endständigen sklerotinisierten Zahn (Z), welcher die Nematoden befähigt, in die Insektenlarven ein- und bis in die Hämolymphe des Wirtinsektes vorzudringen. ►



Klingler J., 1988. Investigation on the parasitism of *Otiorhynchus salicicola* and *O. sulcatus* (Col. Curculionidae) by *Heterorhabditis* sp. (Nematoda). *Entomophaga* **33** (3), 325-331.

Smits P.H., Groenen J.T.M and de Raay G., 1991. Characterization of *Heterorhabditis* isolates by using DNA restriction fragment length polymorphism. Revue Nématol. **14** (3), 445-453.

RÉSUMÉ

Recherche sur la bactérie *Photorabdus luminescens* en tant que symbionte de nématodes entomopathogènes

Les nématodes entomopathogènes du genre *Heterorhabditis* sont utilisés pour contrôler biologiquement les insectes ravageurs au stade larvaire. Durant leur période de vie libre dans le sol, les nématodes parviennent à localiser leurs hôtes potentiels d'une manière physique et chimique. Ils pénètrent dans l'hémolymphe de l'insecte et ils y relâchent la bactérie symbiotique *Photorabdus luminescens*. En se multipliant à l'intérieur de l'insecte, la bactérie fournit la base nutritionelle nécessaire au développement

Abb. 11. Diese rot pigmentierte Larve des Gefurchten Dickmaulrüsslers (*Otiorhynchus sulcatus*) wurde von Nematoden befallen und von den symbiontischen Bakterien *P. luminescens* PW79 infiziert.

de la nouvelle génération de nématodes. Ceux-ci quittent le corps de l'insecte pour rechercher de nouveaux hôtes dans le sol environnant.
In vitro, lors de la multiplication de *P. luminescens* PW79, est apparue spontanément une forme secondaire SW79. Celle ci interfère avec la symbiose et inhibe le développement et la multiplication du nématode. L'objectif principal de cette thèse de doctorat était d'étudier la biologie des deux formes de la bactérie ainsi que leur symbiose avec le nématode.
Des méthodes bactériologiques et chimiques ont été utilisées afin de caractériser le symbionte *P. luminescens* PW79 ainsi que sa forme secondaire SW 79. En utilisant de l'antisérum contre *P. luminescens* et sa forme secondaire, il a été possible d'identifier pour la première fois la bactérie à l'intérieur du nématode. L'hypothèse d'origine selon laquelle la forme secondaire serait identique à la «dauerform» (forme permanente) du tractus intestinal du nématode a été réfutée. La microscopie électronique a été utilisée afin d'analyser la longueur et les sections transversales du tractus intestinal. Il y a env. 2700 bactéries par nématode. Nos études mettent en évidence les cycles des nématodes et de leurs bactéries symbiotiques.
En se basant sur ces résultats, des recommandations ont été présentées afin de maintenir une culture pure de *P. luminescens* PW79 et afin de garantir des conditions optimales à la reproduction des nématodes. L'élevage de masse de nématodes à des fins commerciales sur milieu solide pourrait ainsi être sensiblement amélioré.

SUMMARY

Investigation on the bacterium *Photorhabdus luminescens* as symbiont of insect pathogenic nematodes

Entomopathogenic nematodes of the genus *Heterorhabditis* are used for the biological control of pest insects in their larval stage. During their free-living period in soil, the nematode locates the hosts by physical and chemical means and enters the insect-hemolymph where it releases the symbiotic bacterium *Photorhabdus luminescens*. The multiplication of the bacteria within the insect forms the nutritional basis for the development of a new generation of nematodes, which subsequently leave the insect body to attack other hosts in the surrounding soil.
During the *in vitro* multiplication of *P. luminescens* PW79 a secondary form SW79 occurs spontaneously. It interferes with the symbiosis and inhibits the development and multiplication of the nematode. The investigation of the biology of both forms of bacteria and their symbiosis with nematodes was the main objective of this study.
The natural symbiont *P. luminescens* PW79 and its secondary form SW79 were characterised using bacteriological and chemical methods. The use of antiserum against *P. luminescens* and its secondary form allowed for the first time to identify the bacteria within the nematode. The original hypothesis, that the secondary form is identically to the „dauerform" in the intestinal tract of the nematode, was refuted. Using electron microscopy to analyse length and cross sections through the intestinal tract of the nematode, the number of bacteria per nematode was approximately 2700. The results of the studies allowed the demonstration of the life cycle of nematodes and their symbiotic bacteria.
Based on these results, recommendations were made how to maintain a pure culture of *P. luminescens* PW79 and to guarantee optimal conditions for the reproduction of the nematodes. By preventing losses of whole batches, the base of commercial mass production of nematodes on solid medium could be markedly improved.

KEY WORDS: entopathogenous nematodes, symbiosis, bacteria, life cycle, biological pest control

FOTO-NACHWEIS UND DANK

J. Grunder, FAW Wädenswil und R. Hermann, Labor für Elektronenmikroskopie, Institut für Mikrobiologie, ETH Zürich.
Dieser Artikel ist ein Auszug aus der Dissertation der ETH Nr. 11'952. Die Arbeiten wurden an der FAW Wädenswil und am Institut für Mikrobiologie der ETH Zürich durchgeführt und von Prof. Dr. Lüthy betreut.