

Aus dem Institut für Mikromorphologie, Berlin-Dahlem (Leitung: Prof. H. RUSKA).

Elektronenmikroskopische Beobachtungen der Entstehung filtrierbarer (L-)Formen von *B. proteus* unter Penicillin-Einfluß.

Von

GOTTFRIED BRINGMANN.

Mit 11 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. April 1952.)

Problemstellung.

BOIVIN, TULASNE, VENDRELY und MINCK (1947) sowie BRAUN und YALIM (1948, 1949) beschrieben nach lichtmikroskopischen Untersuchungen an Bakterien, die unter Penicillineinfluß gewachsen waren, eine Hemmung der Zellteilung bei zunächst ungestörter Teilung der Kernäquivalente („Kerne“, „Chromatinkörperchen“). Es entstehen Riesenzellen mit zahlreichen Kernäquivalenten. TULASNE fand in lichtmikroskopisch zellfreien Mikrokulturen von *B. proteus* auf Nährboden mit hohem Penicillingehalt basophile Granula. Nach Fermentbehandlung mit Desoxyribonuklease und Ribonuklease ergab sich, daß die Granula DNS- und RNS-Komplexe enthielten. Sie lagen isoliert oder waren in membranlose Massen eingeschlossen, die sich als RNS-haltig erwiesen. TULASNE hält die Granula, die sich durch Übertragung auf frischen, penicillinhaltigen Nährboden weiterzüchten lassen, für selbständige Organisationsformen der Bakterien, da sie die Fähigkeit besitzen sich zu vermehren. Auf Grund der morphologischen Ähnlichkeit mit dem Erreger der Pleuropneumonie sind die Granula Pleuropneumonia-like-organisms genannt worden, während von KLIENEGER-NOBEL die Bezeichnung L-Formen für ähnliche Entwicklungsstadien von *Streptobacillus moniliformis* eingeführt wurde (1935). Sie werden als filtrierbare Formen charakterisiert. Durch Übertragung von Mikrokolonien von L-Formen auf Penicillin-freien Nährboden konnte TULASNE Normalformen des Ausgangsstammes zurückerhalten. Hieraus schloß er auf die Möglichkeit der Regeneration der L-Formen zu Normalformen. Die L-Formen sind besonders resistent gegen schädigende Einflüsse. TULASNE nimmt als stoffliche Komponente der L-Formen DNS und RNS sowie (nach persönlicher Mitteilung) Lipide an.

Lichtmikroskopische Beobachtungen ähnlicher Granula machten DIENES an einer Reihe von Bakterien, TULASNE an *Pasteurella* und

Salmonella. Die Granula-enthaltenden Mikrokolonien traten spontan oder unter bestimmten Versuchsbedingungen auf. Nicht nur Penicillin, sondern auch eine Reihe anderer Stoffe können nach TULASNES Angaben die Entstehung von L-Formen bewirken, z. B. hohe Konzentrationen bestimmter Kohlenhydrate oder Leichtmetallsalze, subletale Konzentrationen von Schwermetallsalzen und physikalische Reize, wie Kälte oder Röntgenstrahlen. Bei *Bacillus proteus* wurden bestimmte Antikörperkomplexe und bei Typhusbakterien Bakteriophagen wirksam gefunden.

Wir haben an *Escherichia coli* die Bildung von Fadenformen und Spindelformen und intercellularer Granula unter dem Einfluß von Streptomycin, Chloromycetin und Aureomycin lichtmikroskopisch und elektronenmikroskopisch beschrieben und kamen zu dem Ergebnis, daß die elektronenmikroskopisch sichtbaren Granula identisch sind mit den basophilen Körpern der Kernäquivalente im Karyoidstadium, die wir als kombinierte DNS-RNS-Komplexe beschrieben haben. Sie kontrastieren im elektronen-mikroskopischen Bild durch ihre besonders hohe NS-Konzentration. Die Schwärzung durch Osmium-Reduktionsprodukte im Bereich der Karyoide läßt auf die Anwesenheit von Lipoiden, wahrscheinlich speziell Phospho-Lipoiden schließen. Wie wir an anderer Stelle (Planta, Berlin 1952) bereits berichteten, sind die Karyoide auf Grund cytochemischer und physiologischer Befunde sowohl als Kern- wie als Mitochondrienäquivalente aufzufassen.

An den Granula enthaltenden Zellen haben wir bereits nach 24 Std Bakteriolyse beobachtet, wobei die Granula frei wurden.

SCHLOSSMANN und HEDMAN (1950) zeigten in elektronenmikroskopischen Bildern von *Salmonella typhi* nach Penicillin- und Aureomycin-Beeinflussung Zellen mit zahlreichen Granula. Außerdem fanden sie im Zentrifugat der gleichen Kulturen freie Granula derselben Größe. LEMBKE, KÖRNLEIN und FRAHM (1950) beschrieben elektronenmikroskopische Beobachtungen an *B. melitense*. Sie fanden nach 2 Tagen freie „Elementarkörper“ und nach 7 Tagen „kaum noch intakte Zellen“. Die Elementarkörper konnten sie durch Ultra-Zentrifugieren getrennt darstellen.

Vergleicht man die vorausgehend geschilderten lichtmikroskopischen Beobachtungsbefunde TULASNES und unsere licht- und elektromikroskopischen Untersuchungsergebnisse, die durch Untersuchungen anderer Autoren morphologisch bestätigt sind, sowie unsere cytochemischen Untersuchungen über die Doppelnatur der Kernäquivalente der Spaltpflanzen, so kommt man zu der Vermutung, daß die elektronenmikroskopisch sichtbaren, von uns auf Grund cytochemischer Befunde als Kernäquivalente im Karyoidstadium und als Mitochondrienäquivalente angesprochenen Granula und die von TULASNE an Hand lichtmikroskopischer Untersuchungen beschriebenen L-Formen homologe Bildungen sein könnten. Auf Anregung von H. RUSKA haben wir daher an *B. proteus*, an dem

TULASNE seine lichtmikroskopischen Beobachtungen gemacht hat, die nachstehend beschriebenen elektronenmikroskopischen Untersuchungen durchgeführt¹.

Untersuchungsergebnisse.

Wir impften Zellen von *B. proteus* (Bild 1) auf Pferdeserum bzw. Fleischwasser-Lactoflavin-Agar. Dem Nährboden setzten wir pro ml



Abb. 1. *B. proteus*, Normalformen. 10000 : 1, 80 kV.

800 i. E. kristallisiertes Penicillin G Kaliumsalz in m/15 Phosphatpuffer pH 7,2 zu. Nach 16—24 Std entnehmen wir mit befilmten Objektträgerblenden Wuchsproben von der Oberfläche der Platten; an dem in situ entnommenen Untersuchungsmaterial machten wir nachstehende Beobachtungen:

¹ Wir möchten Herrn Prof. TULASNE, Straßburg, für die Überlassung von Untersuchungsmaterial und Herrn Prof. H. RUSKA, zur Zeit State Department of Health, Albany N. Y., USA, für seine Bemühungen um das Zustandekommen dieser Untersuchungen und für seine Anregungen auch an dieser Stelle unseren besonderen Dank aussprechen.

Die Zellen wurden an ihrer Teilung gehindert (Bild 2—7). Ein stark gesteigertes Längenwachstum der eingesäten Zellen, bedingt durch die Hemmung der Zellteilung unter dem Einfluß von Penicillin, war zu beobachten (Bild 2—7).

In den langgestreckten Fadenzellen sahen wir im Elektronenbild zunächst eine Verteilung der Substanz, die wir bereits in unseren früheren

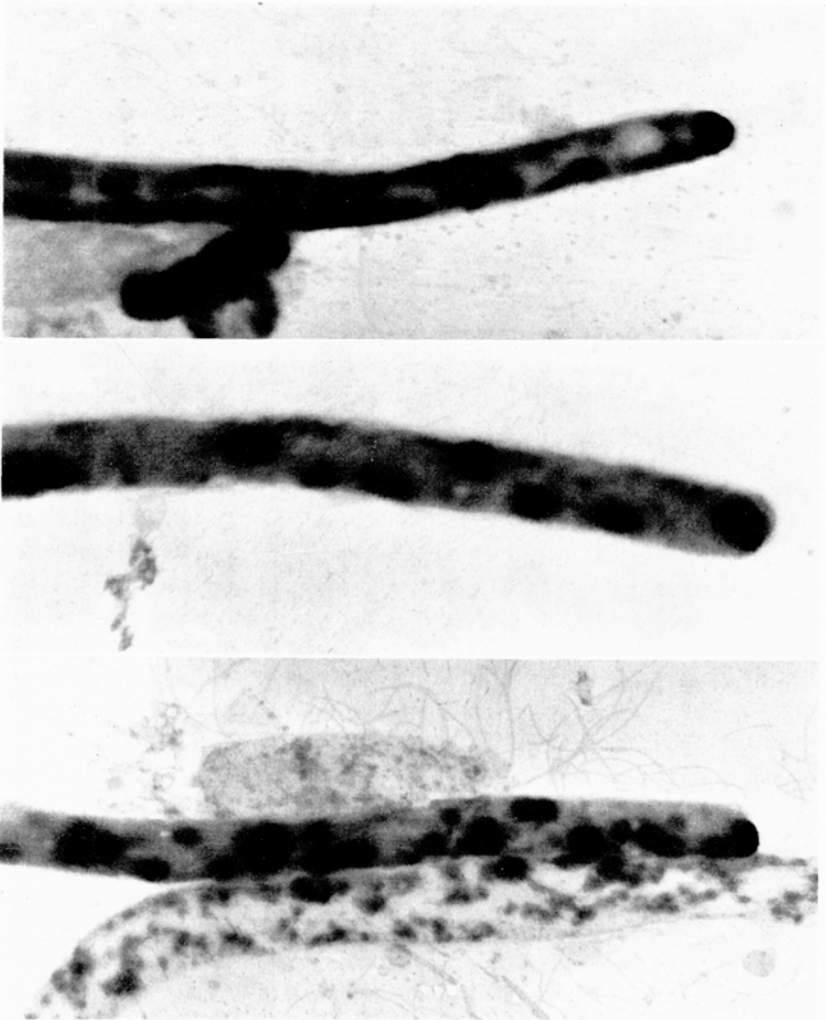


Abb. 2—4. *B. proteus* unter Einfluß von Penicillin. Kulturzeit 24 Std.

Abb. 2. Fadenformen. Teilungsstadien der Kernäquivalente 10000 : 1, 80 kV.

Abb. 3 und 4. Solitäre Kernäquivalente und Teilungsstadien. Zunahme der Zahl der Kernäquivalente. Cytoplasma von mittlerer Dichte. 10000 : 1, 80 kV.

Untersuchungen als Teilungsstadien der kernäquivalenten Körper identifiziert hatten (Bild 2). Die betreffenden Strukturen erschienen als dunkle, langgestreckte Aggregate in dem helleren Cytoplasma, dessen elektronen-

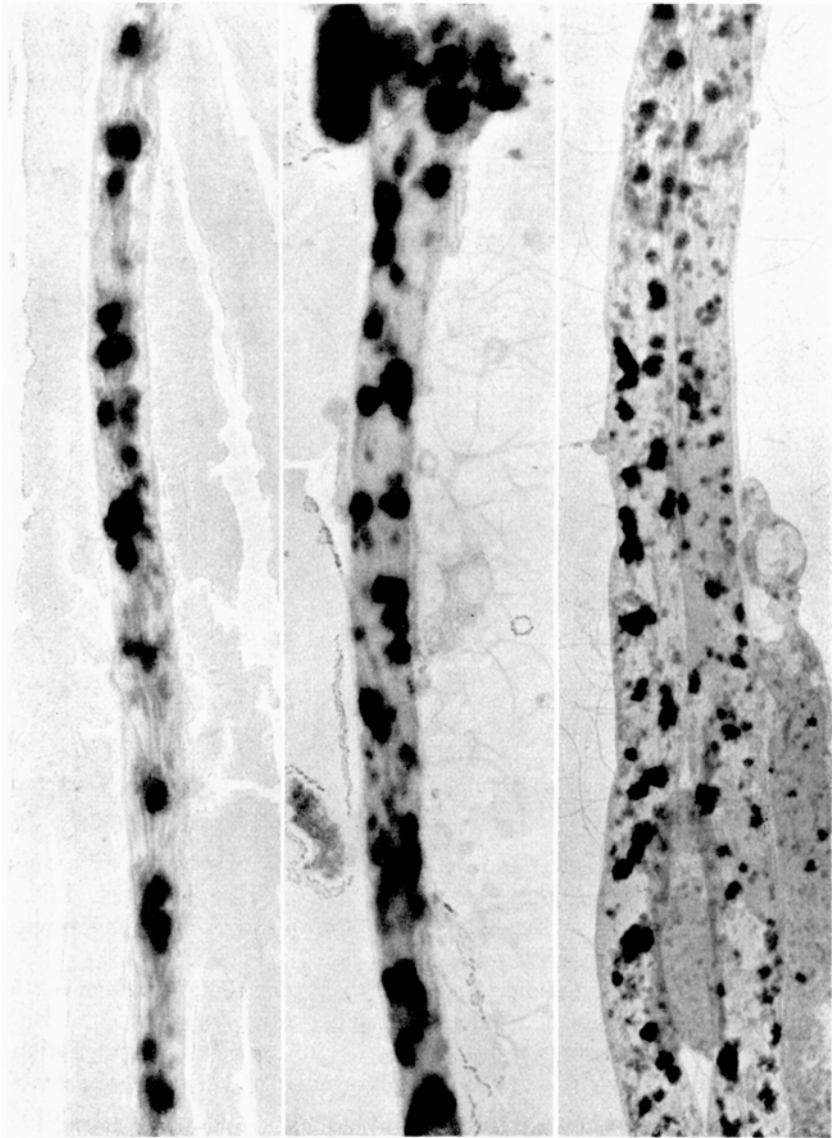


Abb. 5 bis 7: *B. proteus* unter Einfluß von Penicillin. Kulturzeit 24 Stunden.

Abb. 5, 6 und 7. Weitere Zunahme der Zahl der Kernäquivalente. Der Zellraum ist nach dem Schwund der plasmatischen Ribonucleinsäure transparent geworden. 10000 : 1, 80 kV.

mikroskopische Dichte bei abnehmendem RNS-Gehalt geringer war als in normalen Zellen. Die beschriebene Form der Teilung der Kernäquivalente fanden wir auch bei *Escherichia coli* unter dem Einfluß von Streptomycin und Aureomycin. Es ist jedoch nach unseren Befunden nicht die einzige Form, denn wir fanden bei *Escherichia coli* unter Einfluß von Streptomycin auch eine Teilungsform, die als Vielkernbildung an den Orten der ursprünglichen Kernäquivalente zu sehen ist. Im weiteren Verlauf der Entwicklung von *B. proteus* beobachteten wir eine Zunahme

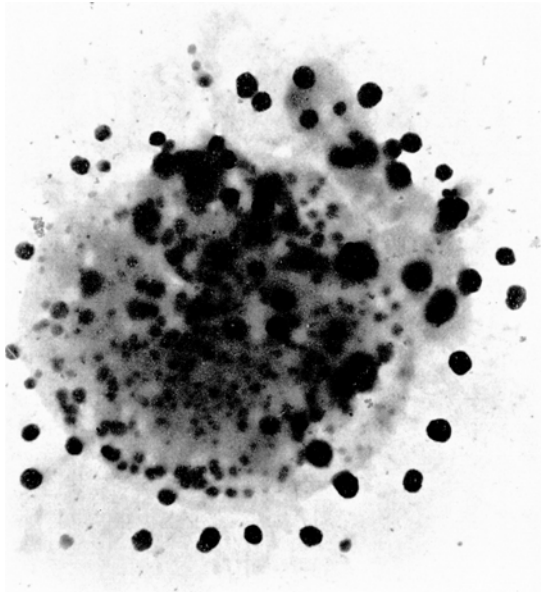


Abb. 8. Riesens-Kugelform mit zahlreichen Inhaltskörpern, die nach Lyse der Mutterzelle bzw. durch mechanische Einflüsse frei wurden.

der Zahl der dunklen Inhaltskörper der Zellen, die wir bereits früher als solitäre Kernäquivalente im Karyoidstadium beschrieben haben (Bild 3 bis 7). Gleichzeitig wurde die Dichte des Cytoplasmas laufend geringer. Der beschriebene Prozeß war nicht in allen Zellen gleichmäßig zu beobachten. Eine große Anzahl von Zellen war zwar ebenfalls stark in die Länge gewachsen, erschien jedoch im elektronenmikroskopischen Bild völlig transparent oder nur mit Resten des Zellinhaltes. Häufiger als Fadenformen beobachteten wir Riesens-Kugelformen (Bild 8) mit zahlreichen Inhaltskörpern. Die umgewandelten Zellen verfallen schließlich der Lyse, und die Kernäquivalente mit Plasmaresten werden frei. Das Elektronenbild dieses Entwicklungsstadiums zeigt neben leeren Zellmembranen aufgerissene Zellen mit zum Teil oder völlig entleertem Zellinhalt (Bild 9).

Wir übertrugen das freie L-Formen enthaltende Kulturmateriale auf den eben beschriebenen festen Penicillin-Nährboden in PETRISchalen. Nach ungefähr 8 Tagen Kulturdauer klatschten wir mit befilmten Objektträgerblenden die auf den Platten sichtbar gewordenen Mikrokolonien

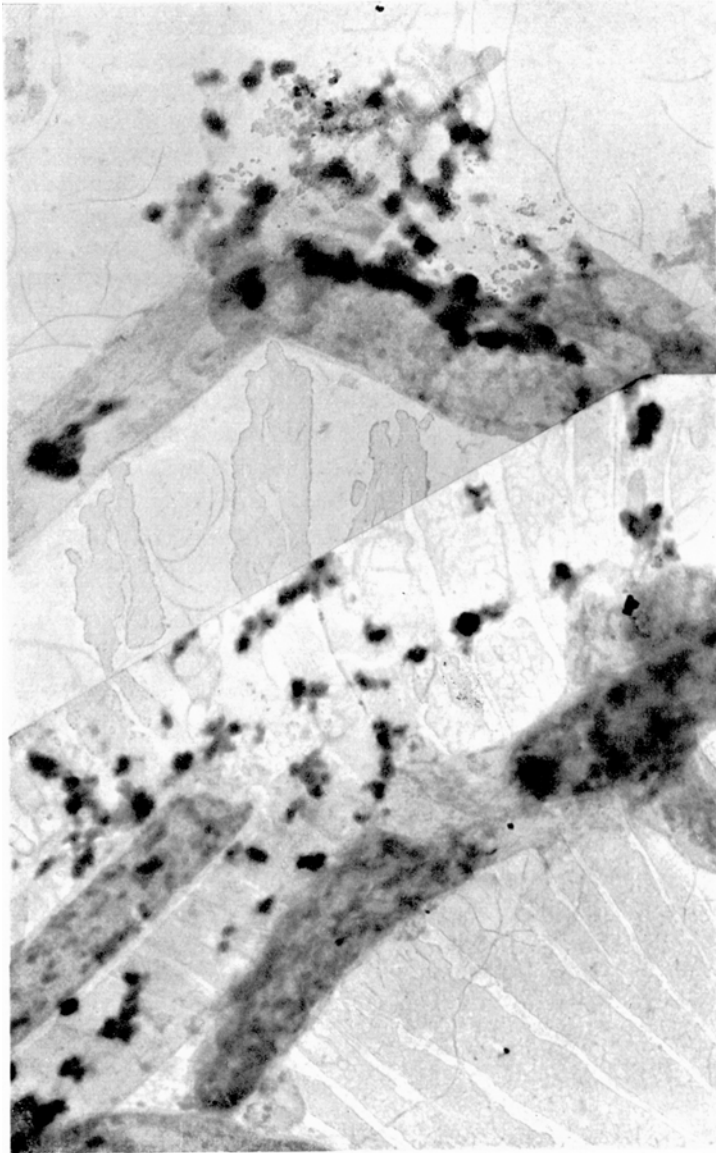
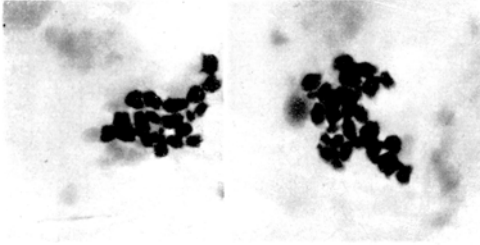


Abb. 9. Zellen in Lyse, Freiwerden der Kernäquivalente mit Cytoplasmaresten (L-Formen). 10000 : 1, 80 kV.

ab. Wir fanden im elektronenmikroskopischen Bild Anhäufungen freier Granula, d. h. Mikrokolonien von L-Formen (Bild 10—11), entweder frei von Begleitsubstanz oder in elektronenmikroskopisch halbtransparenten Substanzenanhäufungen. Bei einer Detailanalyse des Bildmaterials fanden



wir Vermehrungsstadien. Die Elektronenbilder bewiesen hiermit einen Vermehrungsvorgang der freien L-Formen. Unsere Anschauungen über den cytochemischen Aufbau und die Funktion der Zellzentren der Bakterien als kern- und mitochondrienäquivalente Körper lassen deren Fähigkeit einer relativ selbständigen Existenz als Organisationszentren in geeignetem Milieu verständlich erscheinen.

Die Rückwandlung der L-Formen in Normalformen gelangt in einer weiteren Arbeit zur Darstellung.

Zusammenfassung.

Elektronenmikroskopische Beobachtungen gestatten eine morphologische Analyse der Umwandlung von normalen Zellformen von *B. proteus* in L-Formen unter Einfluß hoher Dosen Penicillin. Es entstehen zunächst Faden- oder Kugelzellen mit zahlreichen Kernäquivalenten im Karyoidstadium durch intensive Teilung der Kernäquivalente bei gleichzeitiger Hemmung

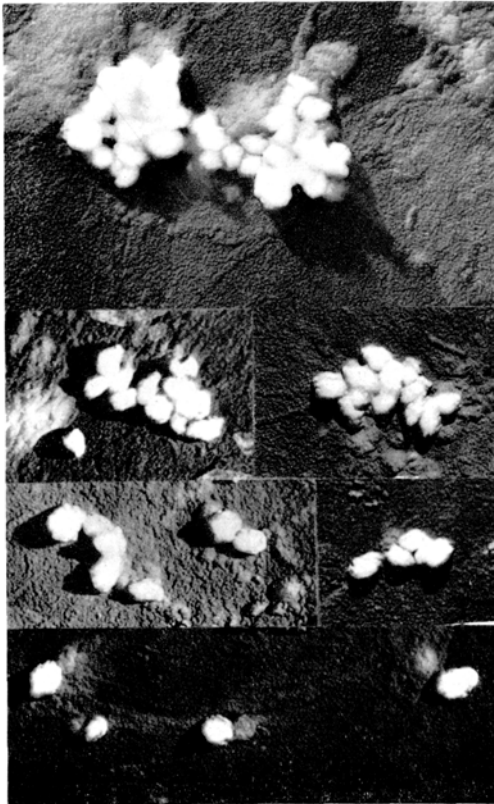


Abb. 10 und 11. L-Formen von *B. proteus*, entstanden und wachsend unter Penicillin-Einfluß. Kulturalter 4 Tage. — 10. 10000 : 1, 60 kV. — 11. Unter einem Winkel von 25–30° metallbeschattet, 12000 : 1, 80 kV. Aus dem tang des Beschattungswinkels errechnet sich das Verhältnis der Achsen senkrechter elliptischer Querschnitte. Die hieraus ersichtliche Dicke der Körper nach Trocknung läßt auf einen hohen Gehalt an Trockensubstanz schließen.

der Zellteilung. Durch Lyse (Zellwandzerstörung) der Mutterzellen werden die Kernäquivalente frei. Sie lassen sich unter geeigneten Bedingungen als selbständige Lebensformen (L-Formen) weiterzüchten und hierbei in situ durch eine geeignete Untersuchungstechnik elektronenmikroskopisch darstellen. Vermehrungsstadien der L-Formen können beobachtet werden.

Die hohe Auflösung des elektronenmikroskopischen Verfahrens gestattet eine genaue Analyse von Vorgängen, die im Lichtmikroskop nur schwer erkannt und nicht mit absoluter Sicherheit in allen Einzelheiten untersucht werden können, da die darzustellenden Objekte hinsichtlich ihrer Größe an oder unter der optischen Auflösungsgrenze des Verfahrens liegen.

Die Elektronenbilder sind mit dem Siemens-Elektronenmikroskop Typ 100b nach E. RUSKA und B. v. BORRIES für 60—100 kV Beschleunigungsspannung aufgenommen worden. Fräulein INGEBORG DIETRICH arbeitete als medizinisch-technische, Fräulein ANNELIESE STÜCKRATH als phototechnische Assistentin mit. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für ihre Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Literatur.

- BOIVIN, A., R. TULASNE, R. VENDRELY et R. MINCK: Extrait des Archives des Sciences physiologique I (1947). — BRAUN, H., u. F. YALIM: Istanbul Seriyati **30** (1948). — Mikrobiol. **2** (1949). — BRINGMANN, G.: Arch. Mikrobiol. **15** (1950). — Planta (Berl.) **38** (1950); **40** (1952). — Zbl. Bakter. I. Orig. **156** (1951); **157** (1951); **157** (1952). — Z. Hyg. **134**, (1952). — DIENES, L. J.: Inf. Dis. **65** (1939). — Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **42** (1939) **44** (1940); **47** (1941); **53** (1943); **55** (1944); **63** (1946) **64**; (1947) **66**; (1947); **68** (1948); **71** (1949); **75** (1950). — J. Bacter. **44** (1942); **50** (1945); **54** (1947); **56** (1948); **57** (1949). — DIENES, L., M. V. ROPES, W. SMITH, S. MADOFF and W. BAUER: New England J. Med. (1948). — DIENES, L., and W. SMITH: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **51** (1942). — DIENES, L., H. WEINBERGER and S. MADOFF: J. Bacter. **59** (1950). — Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **75** (1950). — KLIENEBERGER, E.: J. of Path. **39** (1934); **40** (1935); **42** (1936). — J. of Hyg. **48** (1938); **40** (1940); **42** (1942). — KLIENEBERGER-NOBEL, E.: J. of Hyg. **45** (1947). — J. Gen. Microbiol. **3** (1949); **4** (1950). — KLIENEBERGER-NOBEL, E., and J. SMILES: J. of Hyg. **42** (1942). — LEMBKE, A., M. KÖRNLEIN u. H. FRAHM: Zbl. Bakter. I. Orig. (1950). — RUSKA, H., G. BRINGMANN, I. NECKEL u. G. SCHUSTER: Z. Mikrosk. (1952). — TULASNE, R.: Nature (Lond.) **164** (1949); **160** (1947). — C. r. Soc. Biol. Paris **143** (1949); **144** (1950); (1951). — Bull. Acad. Méd. Paris **133** (1949). — C. r. Acad. Sci. Paris **229** (1949). — Bull. Assoc. Dipl. Microbiol. de la Fac. de Pharmacie de Nancy **36** (1950). — Revue d'Immunologie **15** (1951). — TULASNE, R. et G. BRINGMANN: Revue d'Immunologie (1952). — TULASNE, R., R. VENDRELY, R. MINCK et L. MÜLLER: C. r. Acad. Sciences **230** (1950). — SCHLOSSMANN, K., u. S. HEDMAN: Nordisk Medicin **44** (1950).

Dozent Dr. G. BRINGMANN, Berlin-Dahlem, Faradayweg 16,
Institut für Mikromorphologie.