

tierung dem erst im IV. Stadium festgestellten deutlichen Unterschied in der Konzentration der Aminosäuren zuzuordnen ist, bleibt vorerst ungewiß.

Vorläufig wissen wir nicht, ob der vorliegende Letalfaktor primär oder sekundär störend in den Eiweißstoffwechsel eingreift. Es soll die Aufgabe spä-

terer Untersuchungen sein, die Stoffzusammensetzung und das Eiweißfermentsystem der letalen Larven in möglichst jungen Stadien zu analysieren. Erst dann läßt sich die Beziehung der Proteinstoffwechselstörung zu der zur Letalität führenden Mutationswirkung aufklären.

Struktur des Tuberkulose-Erregers in ultradünnen Schnitten nach Fixierung bei verschiedenen p_H -Werten

VON FRIEDRICH J. BASSERMANN

Aus dem Westdeutschen Tuberkulose-Forschungsinstitut, Honnef a. Rh. (Chefarzt: Medizinaldirektor Dr. W. Ohm) und dem Zentral-Laboratorium für Angew. Übermikroskopie der Universität Bonn (Leiter: Dr. K. E. Wohlfarth-Bottermann)

(Z. Naturforschg. **11 b**, 276—277 [1956]; eingegangen am 23. November 1955)

Eugonisch gewachsene Kulturen pathogener Stämme von *Mycobacterium tuberculosis*, var. hominis, werden bei verschiedenen p_H -Werten fixiert, ultradünn geschnitten und übermikroskopisch untersucht. Der p_H -Wert bei der Fixierung hat keinen erkennbaren Einfluß auf die Ultrastruktur.

Lichtoptische Schnittuntersuchungen an *Mycobacterien*-Kulturen sind selten durchgeführt worden. Die Fragestellungen betrafen den architektonischen Aufbau der Kulturen, die Existenz einer intermikrobiellen Substanz sowie das Verhältnis und die Topographie der säurefesten und nicht-säurefesten Bazillen im Kolonieverband.

Unsere an anderer Stelle¹ vorgelegten elektronenoptischen Untersuchungen an ultradünnen Schnitten eugonisch gewachsener Kulturen pathogener und infektiöser Stämme von *Mycobacterium tuberculosis*, var. hominis, sind eine Ergänzung und Erweiterung früherer Arbeiten über die mikromorphologischen Organisationsprinzipien gerichtet wachsender *Mycobacterien*.

Das Studium ultradünner Schnittbilder von TB diente uns ferner zur besseren Auffindung und Erkennung des Erregers in Schnitten spezifisch infizierten, in vivo entnommenen, menschlichen Lungengewebes. Ferner wurden weitere Einblicke in die cytoplasmatische Feinstruktur und die zellspezifischen Partikelpopulationen der Mikrobenzelle möglich.

Bezüglich des Artefaktproblems wurde der Einfluß

der Wasserstoffionen-Konzentration bei der Fixierung besonders untersucht. Lediglich über die dabei gemachten Beobachtungen wird nachfolgend kurz referiert.

Es wurden 6 eugonisch gewachsene TB-Stämme im Alter von 10 Tagen bis zu 21 Monaten, gewachsen auf Hohn-Substrat 4, untersucht.

Die Fixierung erfolgte in 1%iger, gepufferter Osmiumtetroxydlösung mit einem p_H -Wert von: 7,2 — 6,12 — 2,62.

Das extrazelluläre p_H -Optimum für menschenpathogene *Mycobakterien* liegt trotz der Schwankungen im Laufe der logarithmischen Vermehrungsphase im sauren Bereich bei p_H 6,5 (6,4) 6,2. Das intrazelluläre p_H -Optimum ist unbekannt.

Auf Grund von Elektrophorese- und Färbeversuchen darf vermutet werden, daß der IEP des TB-Cytoplasmas bei einem p_H unter 4,0 liegt [Freund: 2,8—3,0 (1925)²; Moyer: 4,0 (1936)³; Petuely und Holasek: 2,8 bis 3,4 (1950)⁴].

Alle präparativen Partialakte wurden bei einer Temperatur von —1 bis +2° C zur Hemmung der enzymatischen Autolyse durchgeführt.

Die Autolyse ist bei den *Mycobakterien* nach Bloch⁵ ein progressives Phänomen, welches bei 37° C und einem p_H von 5,2—7,0 am stärksten auftritt. Nach Laporte (1942)⁶ sowie Baisden und Yegian (1943)⁷ hem-

Parasitenkunde, Infektionskrankh., Hyg. I. Abt. Orig. **155**, 207 [1950].

⁵ H. Bloch, J. exp. Medicine **91**, 197 [1950].

⁶ R. Laporte, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales **214**, 887 [1942].

⁷ L. Baisden u. D. Yegian, J. Bacteriol. **45**, 163 [1943].

¹ Fr. J. Bassermann, Beitr. Klin. Tuberkul., **115**, 173 [1955].

² J. Freund, Amer. Rev. Tuberkul. **12**, 124 [1925].

³ L. S. Moyer, J. Bacteriol. **31**, 531 [1936].

⁴ F. Petuely u. A. Holasek, Zbl. Bakteriolog.,

men bereits 0,5% Formaldehyd die spontane mycobakterielle Autolyse völlig; indessen hatten Joffe und Mudd (1935)⁸ bereits vorher gezeigt, daß dadurch die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit der *Mycobakterien* gegenüber unbehandelten Kontrollen nicht nachweisbar beeinflußt wird.

Entwässerung der Präparate erfolgte in der Alkoholreihe. Einbettung in *n*-Butyl-Methacrylat; Polymerisation mittels Benzoylperoxyd.

Ultramikrotom nach F. J. Sjöstrand mit thermischem Vorschub. Präparation auf Netzblenden (Hütchen) nach Kircher. Siemens-Elektronenmikroskop nach H. Ruska und B. v. Borries, Typ UM 100 d, Strahlspannung: 80 kV.

Die Schnitte ließen kein amorphes oder strukturiertes intermikrobielles Substrat erkennen, wie es als „Kittsubstanz“, „cyanophile Substanz“ oder „Nährboden“ auf Grund früherer lichtoptischer Untersuchungen vielfach diskutiert worden ist (Abb. 1*).

Vergleichsweise zeigte der fixierte Eiernährboden nach Hohn im Schnitt ein feinkörniges, amorphes Gefüge. Innerhalb der TB-Kollektive wurde ein derartig unverkennbares Medium nicht beobachtet.

Die unter verschiedenen Winkeln angeschnittenen Bazillen sind in jungen Kolonien dicht und gleichmäßig in strangförmigen Zügen geordnet (Synonyma: Zöpfe, „cords“, Kordeln); erst in älteren Kulturen treten Zonen regelloser Lagerung auf mit zunehmend zahlreichen, optisch leeren Zellhüllen („ghosts“) autolyserter Bazillen.

In keinem Fall waren modulierende präparative p_H -Einflüsse mit Sicherheit erkennbar.

Die Diskussion um Eigenschaften und Struktur der Grenzfläche säurefester Mikroben hat seit 70 Jahren immer eine besondere Rolle gespielt. Die als Arbeitshypothese allgemein diskutierte Vorstellung von einem mehrschichtigen Bau der mikrobiellen Zellgrenze findet in unseren Bildern eine Stütze.

Die Grenze des eigentlichen Zellprotoplasten wird durch eine ungemein zarte, aber optisch klar definierte Linie markiert. Dieser Grenzfläche werden vorwiegend permeable Funktionen zur Aufrechterhaltung des Ionenmilieus zugesprochen. Im allgemeinen liegt der Protoplast der nächsten (zweiten) Schicht

dicht an (Abb. 2 a und b). In zahlreichen Zellexemplaren wird indessen eine Retraktion des Protoplasten erkennbar (Abb. 2 c und e).

Diese zweite (mittlere) Schicht tritt besonders markant hervor. Sie ist von großer einheitlicher Dichte, scharf in den Konturen, gleichmäßig breit und zeigt nur bei lysierten, geschrumpften Bazillen Faltenwurf und Knitterbildung. Diese Schicht dürfte vorwiegend mechanische Funktionen zu erfüllen haben.

Schließlich wird an zahlreichen Zellexemplaren eine inkonstant vorhandene, wenig scharf profilierte, in den Konturen weiche und verwaschene äußerste Grenzphase sichtbar.

Es wäre an ein exkretiertes, auswaschbares Substrat zu denken, wie es als „cord factor“ von Bloch und Mitarb.⁵ diskutiert wird.

Die Massedichte des Protoplasten und die Vielfalt der Binnenstrukturen ist altersabhängig. Innerhalb der einzelnen Zelle bestehen neben Zonen gleichmäßiger Dichte solche, die eine feinkörnige oder bandförmige Ordnung besitzen. An Details finden sich die bekannten elektronendichten (Abb. 2 d), Phosphate tragenden granulären sowie vakuoläre Gebilde; runde bis ovale Bezirke, die ein ungemein zartes Netzwerk (Abb. 2 a, c, e) mit knotigen Verdichtungen an den Maschenstößen aufweisen. Sie sind gegen das übrige Cytoplasma durch eine eigene Phasengrenze abgesetzt.

Seltener und nur in günstig angeschnittenen, meist sehr massedichten Mikroben finden sich kleinere, durchweg zentral gelegene, vereinzelt subpolar und dann paarig orientierte (Abb. 2 b), rundlich-ovale, immer identisch organisierte Bildungen, die lageidentisch mit den Kernäquivalenten sein dürften. Sie besitzen einen großen Reichtum an vielgestaltigen Feinstrukturen. Eine eingehende Beschreibung sowie Stellungnahme zum Artefaktproblem haben wir an anderer Stelle gegeben¹.

Überraschenderweise hat der p_H -Wert bei der Fixierung keinen erkennbaren Einfluß auf die cytoplasmatische Ultrastruktur und die Zellbegrenzung der untersuchten Stämme.

⁸ E. W. Joffe u. S. Mudd, J. gen. Physiol. 18, 599 [1935].

* Abb. 1 u. 2 s. Tafel S. 280 a u. b.

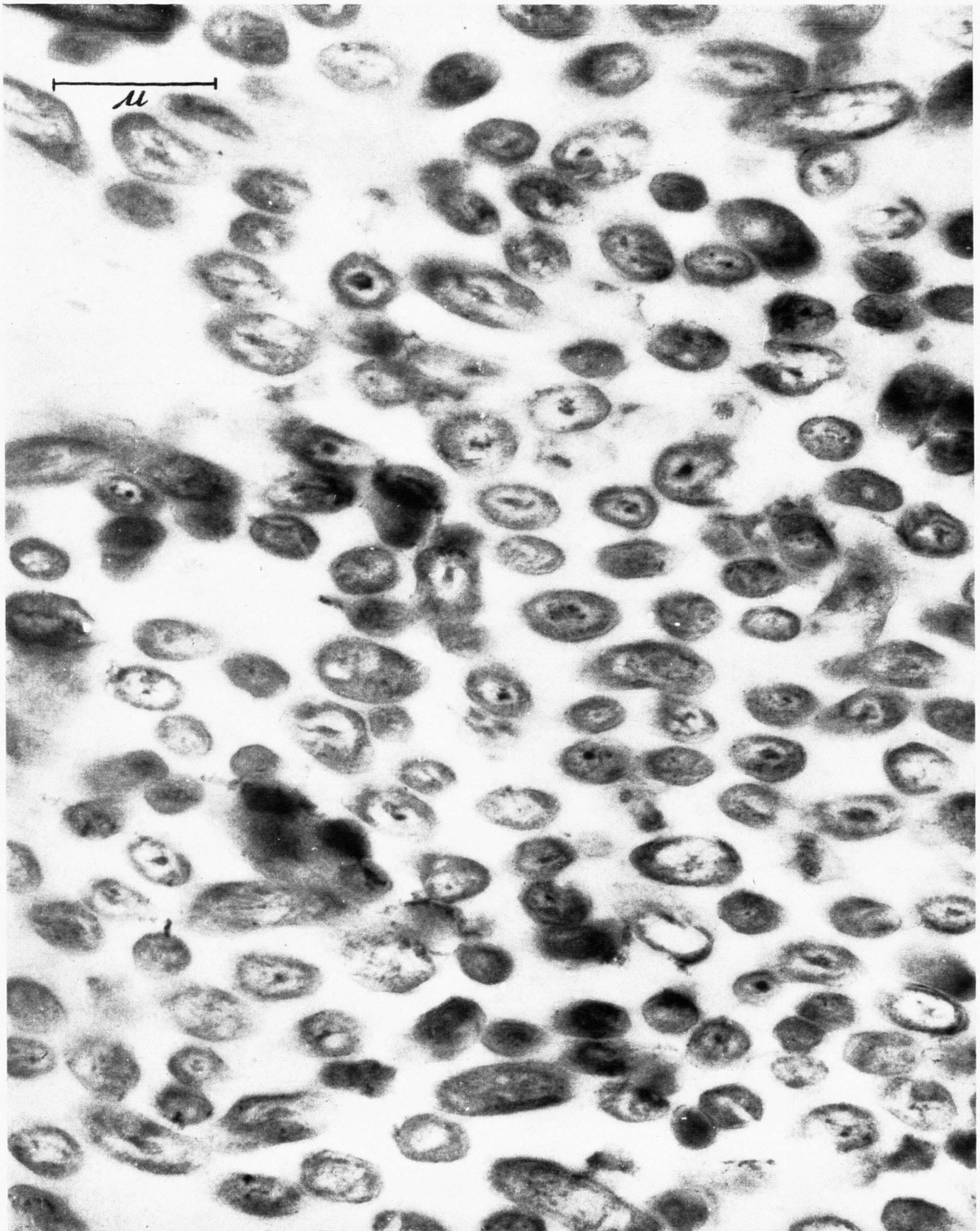


Abb. 1. *Mycobacterium tuberculosis*, var. *hominis*. Zopfformation. 3 Wochen alte Kultur. p_{H} 7.2. Elektronenoptisch: 7300 : 1. Endvergrößerung 27 000 : 1.

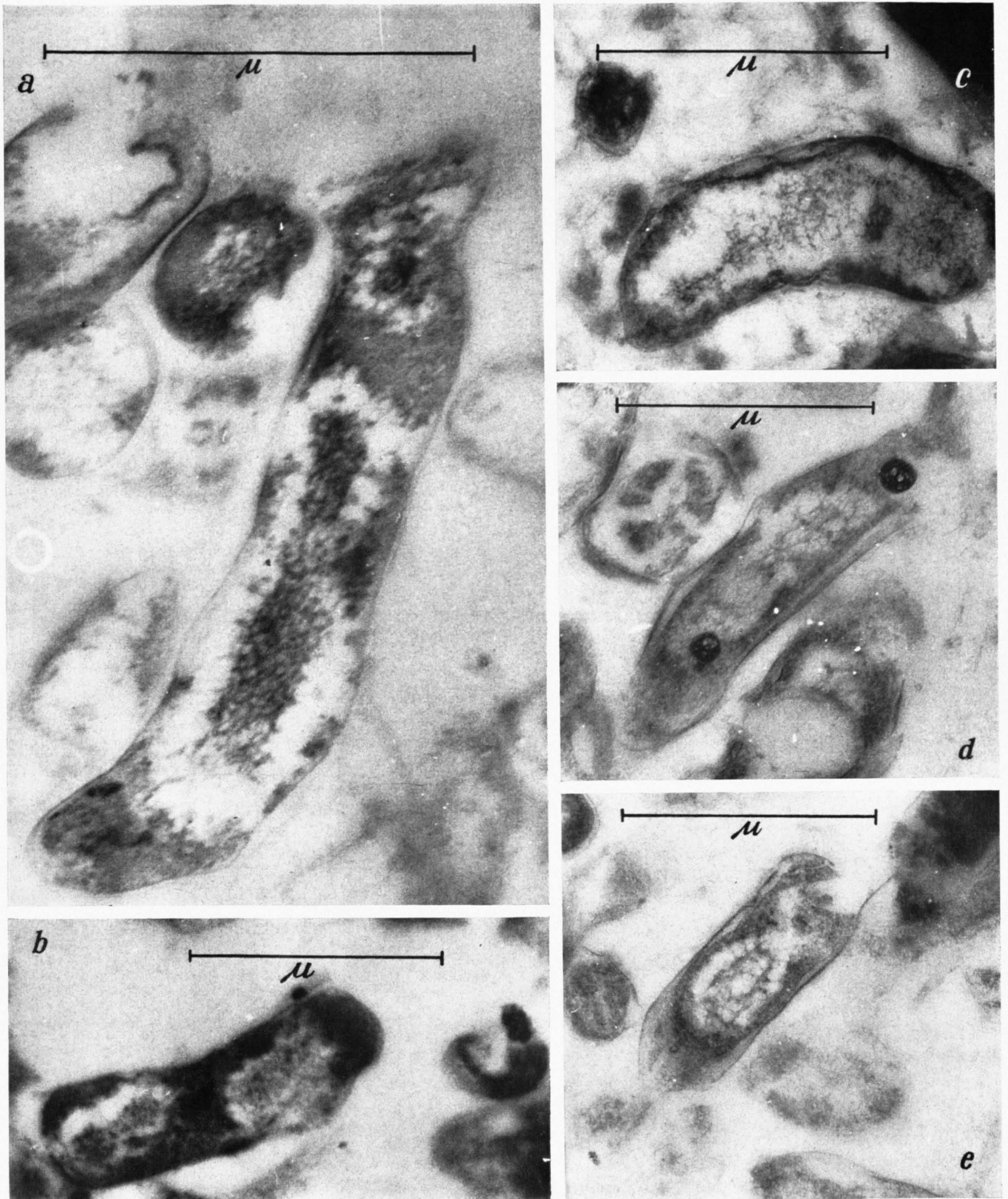


Abb. 2. *Mycobacterium tuberculosis*, var. hominis. a) Stamm H₃₇Rv, 6 Wochen alte Kultur, p_H 7,2. Elektronenoptisch: 24 800 : 1. Endvergrößerung 72 000 : 1. b) 3 Wochen alte Kultur, p_H 2,62. Elektronenoptisch: 13 400 : 1. Endvergrößerung 42 000 : 1. c) 3 Wochen alte Kultur, p_H 2,62. Elektronenoptisch: 13 400 : 1. Endvergrößerung 48 000. d) 6 Wochen alte Kultur, p_H 6,12. Elektronenoptisch: 13 400 : 1. Endvergrößerung 43 000 : 1. e) 10 Tage alte Kultur, p_H 6,12. Elektronenoptisch: 13 400 : 1. Endvergrößerung 42 000 : 1.