

Aus dem Hygiene-Institut der Stadt und Universität Frankfurt am Main

Morphologische Befunde an fixierten und unfixierten Mykoplasmen

K. Reuss, C. Plescher, D. Hülser und K. Herzberg¹

Mit 4 Tafeln

Eingegangen am 6. September 1966

In zahlreichen jüngeren Publikationen fällt die außerordentliche Polymorphie von negativkontrastierten Mykoplasmen auf. Neben großen Formen mit Durchmessern von 0,5–1 μ und darüber mit nur einem Fortsatz wurden bizarre Gebilde mit vielen langen Ausläufern abgebildet. Bei manchen Stämmen wurden sogar fast ausschließlich Filamente gefunden. Auch in Schnittpräparaten sah man längs- oder schräggeschnittene Filamente (ANDERSON; ANDERSON und BARILE; ANDERSON und MANAKER; NELSON und LYONS; HUMMELER; HUMMELER, TOMASSINI und HAYFLICK; HOROSZEWICZ). Im Gegensatz dazu wurden von DMOCHOWSKI et al. Bilder von runden Mykoplasmen ohne Ausläufer veröffentlicht. ANDERSON führte diese abweichenden Befunde auf Unterschiede in der Technik zurück. Damit ist der Streit um die Morphologie der Mykoplasmen, über die bereits früher keine einheitliche Auffassung erreicht werden konnte (FREUNDT; DIENES; LIEBERMEISTER; KLIENBERGER-NOBEL), in ein neues Stadium getreten. In nahezu allen Arbeiten wurde auf die Polymorphie und Plastizität der Mykoplasmen hingewiesen. Die Möglichkeit der Entstehung von Artefakten bei der elektronenmikroskopischen Präparation wurde oft diskutiert, in den neueren Arbeiten nach Einführung der Negativkontrastierung aber nicht ausführlicher untersucht.

Wir begannen eigene Untersuchungen über die Morphologie der Mykoplasmen, weil wir die Gefahr einer Verwechslung von Mykoplasmen mit Influenzaviren im negativkontrastierten Bild überprüfen wollten. Eine solche Verwechslung erschien nach den Befunden von HUMMELER, der „myxovirus-like elementary bodies“ von Mykoplasmen abbildete, durchaus möglich (s. die vorangehende Arbeit). Im weiteren Verlauf der Untersuchung ergaben sich so aufschlußreiche Befunde über den Einfluß der Fixierung auf die Morphologie der Mykoplasmen, daß wir es für gerechtfertigt halten, sie zu veröffentlichen.

Material und Methoden

Mykoplasmenstämme

Wir untersuchten 10 Mykoplasmastämme¹. Der Stamm „Negroni“ wurde aus einem leukämischen menschlichen Knochenmark isoliert (NEGRONI): Von diesem Stamm wurden

¹ Die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützte die Arbeit durch Forschungsgeräte.

zwei verschiedene Linien untersucht: „Mill Hill“ erhielten wir direkt von Dr. NEGRONI und „Philadelphia“ von Dr. HAYFLICK (s. HUMMELER, TOMASSINI und HAYFLICK). Beide Linien verhielten sich völlig gleich. Der Stamm „Negroni“ wurde von CLYDE serologisch als *M. pulmonis* identifiziert (HAYFLICK)². Ferner untersuchten wir je einen Stamm von *M. pneumoniae* und *M. laidlawii* A sowie nicht identifizierte Stämme, die vom Menschen, vom Mähnspringer (*Ammotragus lervia*; s. BRACK), vom Rind (Pleuropneumonie), vom Kaninchen und vom Schwein isoliert worden waren.

Züchtung:

Gut wachsende Stämme hielten wir auf Blutplatten mit 0,5% Glukose, anspruchsvollere auf Difco-PPLO-Agar mit 1% Hefeextrakt (Difco), 0,5% Glukose und 20% Pferde- oder Kälberserum. Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden sie auf „brain-heart-infusion“-Brühe (Difco) mit den gleichen Zusätzen und 0,2% Gelysate (Baltimore Biol. Lab.) übertragen. Brühepassagen wurden in Intervallen von 24–72 Std. angelegt. Bei manchen Stämmen waren 10 und mehr Passagen nötig, bis ausreichendes Wachstum erzielt wurde. Zur Untersuchung verwendeten wir 18–72 Std. alte Bouillonkulturen, wobei wir uns nur nach der Sedimentmenge und nicht nach dem physiologischen Alter der Kulturen richteten.

Elektronenmikroskopische Präparation

Bouillonkulturen wurden 30 min bei etwa 6500 g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde der Röhrchenboden um das Sediment herum mit Filterpapier getrocknet. Ein Teil des Sediments wurde mit der Öse in einem Tropfen Phosphorwolframsäure (PWS) (3%ig, pH 6,1–6,3, mit 0,1% Rinderserumalbumin) auf einem Glasobjektträger verrieben. Mit dieser Mischung wurden Objektblenden beschickt (Pt/Au-Siebenlochblenden mit Formvar als Trägerfolie), überschüssige Flüssigkeit wurde nach einigen Sekunden verschieden stark mit Filterpapier abgesaugt, um eine Abstufung der Schichtdicke auf der Blende zu erzielen. Die Mischung auf dem Glasobjektträger wurde mit PWS weiterverdünnt und auf neue Objektblenden gebracht, um auch eine Abstufung des Mischungsverhältnisses Mykoplasmen/PWS zu erhalten.

Zur Fixierung wurde 10%iges Formalin (Handelspräparat mit 35 Gew.% Formaldehyd, 1:10 mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung pH 7,2 verdünnt) oder 0,5–1,0% Osmiumtetroxyd in der gleichen gepufferten Kochsalzlösung verwendet. Etwas Sediment wurde in einen Tropfen Fixierungsmittel eingerieben und das Gemisch in einer feuchten Kammer gehalten. Wir fixierten mit Formalin 15 min bei 22°C, mit OsO₄ 5–15 min bei 22°C oder 10–30 min bei 4°C, fügten anschließend PWS hinzu und präparierten Objektblenden mit abgestufter Mischung und Schichtdicke wie oben.

Von jeder Präparation wurden einige Blenden vor oder nach der Betrachtung im Elektronenmikroskop in Aq. dest. gewaschen und mit Pt/Ir unter einem Winkel von etwa 20° bedampft.

Aufnahmen machten wir mit einem Siemens-Elmiskop I mit Feinstrahlkondensator bei 80 kV und Vergrößerungen von 8000–40000.

Ergebnisse

Im unfixierten, PWS-kontrastierten Präparat des Schafstammes erkennt man sehr bizarre Gebilde mit kürzeren oder längeren, manchmal verzweigten Ausläufern. Diese können vom Rand eines Hauptkörpers nach verschiedenen Richtungen ausstrahlen und sehr verschieden dick sein. In ande-

¹ Für die Überlassung der Stämme danken wir den Herren Dr. HAYFLICK (Philadelphia), Prof. Dr. KANDLER (Weihenstephan), Priv. Doz. Dr. KRECH (St. Gallen), Prof. Dr. Liebermeister (München), Dr. NEGRONI (Mill Hill) und Prof. Dr. SCHOOP (Frankfurt/Main).

² Siehe auch FALLON, R. J., GRIST, N. R., INMAN, D. R., LEMCKE, R.M., NEGRONI, G. and WOODS, D. A.: Brit. Med. J. 1965 II, 388–391.

ren Fällen sieht man nur ein langgestrecktes, gewundenes Gebilde (Abb. 1). Diese vielgestaltigen Formen liegen an Stellen, an denen relativ viel PWS auf der Blende angetrocknet ist. Auf derselben Blende kann man Stellen finden, an denen die PWS-Schichtdicke kontinuierlich abnimmt. Damit wandelt sich zugleich das Bild der Mykoplasmen. Die in der dickeren Schicht schlangenartig gewundenen Gebilde gehen in abgeplattete, großflächige Formen über, die nur selten einen filamentösen Ausläufer haben (Abb. 2 unten). Dieses an Pflasterepithel erinnernde Bild wird bei weiterer Abnahme der PWS-Schichtdicke auf der Blende noch deutlicher (Abb. 3).

Im Gegensatz zu dieser Polymorphie im unfixierten Präparat erscheinen die Mykoplasmen des gleichen Stammes im formalin-fixierten Präparat ziemlich gleichförmig. Selbst bei großer Schichtdicke sieht man nur annähernd runde Formen, deren Durchmesser allerdings erheblich variieren (Abb. 4). Zwei Arten von Partikeln können unterschieden werden. Man findet einerseits kompakte Partikel mit wenig strukturiertem Innerem, die annähernd Kugelform haben, wie an der Schattenlänge im schrägbedampften Präparat zu erkennen ist (Abb. 6). Ihre Durchmesser liegen meist um $300\ \mu$, können aber von $100\text{--}750\ \mu$ schwanken. Andererseits sieht man stark abgeflachte Partikel mit Durchmessern bis über $1,5\ \mu$, die einen mehr oder weniger zerstörten Eindruck machen (Abb. 5 und 6).

Die Fixierung mit Osmiumtetroxyd führt insofern zu dem gleichen Ergebnis, als auch hier intakte Partikel rund sind und keine Ausläufer haben. Hingegen werden die Mykoplasmen durch OsO_4 stärker geschädigt. Viele Partikel weisen Defekte auf, die Oberfläche zeigt oft Falten. Manchmal sieht man, daß der Inhalt zerstörter Partikel als strukturlose Masse, zum Teil zu Fäden ausgezogen, in der Umgebung der Partikel liegt. Solche im Bild weiß erscheinenden Fäden sind auch in unfixierten Präparaten zu finden, ohne daß ihr Ursprung immer zu erkennen wäre (Abb. 1).

Diese an einem Mykoplasma Stamm vom Schaf erhobenen Befunde wurden an dem von einem Leukämiefall isolierten „Negroni“-Stamm, den auch HUMMELER untersucht hat, in gleicher Weise reproduziert. Im unfixierten Präparat waren an manchen Stellen sogar noch extremere Faden- und Schlangenformen entstanden. Nach Fixierung waren alle Partikel rund (REUSS). Wieder fanden sich einerseits hohe, kompakte und andererseits großflächige, flache Partikel mit deutlicher Schädigung. Die kleinsten kompakten Partikel dieses Stammes hatten Durchmesser von etwa $80\text{--}100\ \mu$ und lagen damit in der Größenordnung der „elementarkörper-ähnlichen“ Partikel. Bei drei weiteren Mykoplasma Stämmen (vom Rind, vom Kaninchen und aus menschlichem Urin) waren nach Fixierung ebenfalls alle Partikel rund und ohne Ausläufer.

An zwei Stämmen (Schaf, „Negroni“) wurde der Einfluß des osmotischen Drucks auf die Morphologie der Mykoplasmen untersucht. Bouillonkulturen gleichen Alters wurden zentrifugiert, das Sediment das eine Mal in $0,85\%$ iger NaCl-Lösung ($\text{pH}\ 7,2$), das andere Mal in Aq. dest. aufgenommen, beide 30 min bei etwa $6500\ \text{g}$ zentrifugiert, die Sedimente in etwas Überstand aufgenommen und dann mit Formalin oder OsO_4 fixiert. In den mit Aq. dest. behandelten Präparaten fanden sich ebenso bizarre Verformungen mit extrem langen filamentösen Ausläufern wie sonst in unfixierten Präparaten (Abb. 7). Diese Versuche mit Aq. dest. zeigen, daß die in der hypotonen Suspension entstandenen Filamente die weitere Präparation (Zentrifugieren, Fixieren,

Trocknen auf der Blende) überstehen und daß das Fixierungsmittel nicht etwa zur Abrundung der Partikel führt. Aber auch in der 0,85%igen Kochsalzlösung hatten sich einige kleine Ausläufer gebildet, die zum Teil Auftreibungen am Ende zeigten (Abb. 8). Diese wurden manchmal als kleine Kugeln abgeschnürt (Abb. 9). Abbildung 8 läßt besonders deutlich erkennen, daß die Ausläufer vor dem Trocknen in alle Richtungen des Raumes ausstrahlten und nicht – wie in unfixierten Präparaten – nur vom Rand der Partikel aus parallel zur Trägerfolie. Die Einwirkung hypertoner Kochsalzkonzentrationen führte in Verbindung mit der nachfolgenden Fixierung mit 1%igem OsO_4 zur Zerstörung der Mykoplasmen.

War PWS in das Innere der Mykoplasmen eingedrungen, so stellte sich an diesen eine Grenzmembran dar. Deutlich war sie allerdings nur bei abgeflachten, defekten Partikeln zu erkennen. Auf dieser Membran lag außen eine flockige Substanz ohne regelmäßige Struktur. Die Dicke dieser Schicht wechselte nicht nur von Partikel zu Partikel, sondern war auch um ein einzelnes Mykoplasma herum nicht konstant. Sie fand sich auch an großen Formen, war aber am deutlichsten an kleinen Partikeln des „Negroni“-Stammes (Abb. 11–15). Solche Mykoplasmapartikel gewannen dadurch ein Aussehen, das an Myxoviren erinnern konnte. Von diesen waren sie aber durch die wechselnde Schichtdicke der Auflagerung und durch die unregelmäßige Anordnung, die nur selten spike-ähnlich war, zu unterscheiden. Ein direkter Vergleich der Abbildungen von Mykoplasmapartikeln mit einem Influenzavirusbild gleicher Vergrößerung (Abb. 16) läßt den Unterschied deutlich erkennen. Auflagerungen aus flockulärer Substanz wurden in fixierten und unfixierten Präparaten des „Negroni“-Stammes gefunden sowie in solchen, die mit Aq. dest. oder 0,85%iger Kochsalzlösung gewaschen worden waren. Ebenso deutlich waren sie beim Rinderstamm, weniger ausgeprägt bei den anderen Stämmen. Nur beim Schafstamm waren sie nicht sicher nachweisbar.

Neben den bisher beschriebenen Formen wurden in unfixierten und fixierten Präparaten kleinere Bläschen oder Schläuche gefunden, die teils frei neben den großen Formen lagen, teils mit diesen durch breitere oder schmale Brücken verbunden waren (Abb. 10). Meist waren sie klein mit Durchmessern von etwa 30–150 μ , nur wenige erreichten Durchmesser bis 250 μ . Gegen die Umgebung waren sie sehr scharf durch eine helle Linie wechselnder Breite begrenzt. Das Innere zeigte die gleiche Struktur wie der Untergrund. Diese Bläschen wiesen keine Auflagerungen aus flockulärer Substanz auf, selbst wenn sie aus Partikeln hervorgingen, die sehr deutliche Auflagerungen hatten (Abb. 15).

Diskussion

Die in unserer Abbildung 1 dargestellten polymorphen Mykoplasmaformen mit langen, filamentösen Ausläufern entsprechen denen, die z. B. in Abbildungen von *M. hominis* Typ 1 (ANDERSON und BARILE 1965) sowie von *M. pulmonis* (NELSON und LYONS) zu sehen sind. Die Gegenüberstellung mit den folgenden Aufnahmen zeigt deutlich, in welchem Maße die Ausbildung solcher Formen von präparativen Einflüssen abhängt. Sogar auf der gleichen Blende waren an Stellen mit viel Material sehr stark verformte, bizarre Mykoplasmen in dicker PWS-Schicht, an anderen Stellen fast einzeln liegende Partikel mit nur geringer Verformung in dünner PWS-Schicht zu finden.

Durch Abstufung der Schichtdicke auf der Blende und des Mischungsverhältnisses Mykoplasmasediment/PWS konnten alle Formen von nahezu rund bis extrem verformt aus dem gleichen Ausgangsmaterial künstlich erzeugt werden. Wurden die Mykoplasmen vor dem Mischen mit PWS mit 10%igem Formalin fixiert, so blieben sie auch in dicken Schichten rund. Man konnte zwei verschiedene Formen unterscheiden: kuglige, hohe Partikel mit Durchmessern zwischen 100 und 750 μ und stark abgeflachte, offenbar teilweise zerstörte Partikel mit meist sehr viel größerem Durchmesser bis über 1,5 μ und nicht ganz regelmäßiger Kontur, die vielleicht Absterbeformen sind. Keine dieser beiden Formen zeigte Ausläufer.

Dieser Befund, d. h. die dosierbare Verformung bis zu sehr langen Filamenten im unfixierten Zustand und die runde Form im fixierten Präparat, wurde an zwei verschiedenen Stämmen erhoben (Stamm „Negroni“ und Schafstamm). Er wurde an drei weiteren Stämmen insofern bestätigt, als auch bei diesen nach Fixierung nur runde Formen gefunden wurden.

Die Fixierung mit Osmiumtetroxyd war unbefriedigend, weil die Mykoplasmen meist stärker geschädigt wurden. FREUNDT hatte schon 1958 darauf hingewiesen, daß Formaldehyd Mykoplasmen schonender fixiert als Osmiumtetroxyd. Aber auch längere Formalinfixierung oder die Anwendung höherer Konzentrationen führten in unseren Versuchen zu einer Schädigung der Mykoplasmen. Diese Beobachtung bestätigt erneut die Feststellung von ZEIGER, daß jede Fixierung eine schädigende Wirkung hat.

BONAR et al. haben die Bildung von Artefakten bei der Präparation eines aviären *Myeloblastosevirus* (BAI Stamm A) ausführlich untersucht. Die Trocknung unfixierter Viruspartikel in PWS-Lösung führte zur Bildung geschwänzter Formen, fixierte Partikel blieben rund, wurden aber etwas abgeplattet. Die Autoren führten die Deformierung auf die Wirkung der Oberflächenspannung und der steigenden Salzkonzentration im Suspensionsmedium während des Trocknens zurück. Wenn beim Trocknen auf einem Agarblock die Salzlösung in den Agar diffundierte und deshalb der osmotische Druck in der Umgebung der Virusteilchen beim Trocknen nicht stieg, blieben die Partikel rund. Über ähnliche Befunde hatten bereits SHARP et al. berichtet.

DE HARVEN und FRIEND fanden bei einem Mäuseleukämievirus geschwänzte Formen, wenn im Verlauf der Anreicherung hypertone Lösungen verwendet wurden, hingegen runde Formen bei Reinigung in isotonem Milieu. In beiden Fällen wurden die Partikel vor dem Trocknen fixiert.

In unseren Versuchen konnte die deformierende Wirkung einer hypertonen Kochsalzlösung auf das Influenzavirus demonstriert werden (s. Abb. 10 und 11 der vorangehenden Arbeit). Der entsprechende Versuch mit Mykoplasmen führte zu keinem eindeutigen Ergebnis, weil sie zu stark geschädigt wurden. Es zeigte sich aber, daß bereits die halbstündige Einwirkung einer isotonen NaCl-Lösung Deformierungen der Mykoplasmen hervorrief. Dieser Befund stimmt mit Beobachtungen von KIM et al. überein, die eine relativ kurze Überlebensdauer von Mykoplasmen in 0,85%iger Kochsalzlösung feststellten. Unsere Abbildung 8 macht zudem den Unterschied der Verformung auf der Blende und in Suspension deutlich: von dem hier gezeigten, in Suspension deformierten und fixierten Partikel gehen Ausläufer auch von der Oberseite aus, während bei unfixierten Partikeln, die erst auf der Blende beim Eintrocknen deformiert werden, Ausläufer nur vom Rand ausgehen (Abb. 1).

Viel stärkere Deformierungen wurden durch Suspendieren der Mykoplasmen in Aq. dest. erzeugt (Abb. 7). Ähnliche Ergebnisse erzielte BAKER mit osmotisch lysierten Erythrocyten. Unter dem Einfluß des erniedrigten os-

motischen Drucks entstanden an der Oberfläche der Erythrocyten sehr lange, z. T. verzweigte Ausläufer, die im negativkontrastierten Bild eine erstaunliche Ähnlichkeit mit den bei Mykoplasmen beobachteten Filamenten aufwiesen. Am Ende der Filamente fand er häufig eine Auftreibung, die manchmal ganz abgeschnürt wurde. An anderen Stellen waren die Filamente stark segmentiert oder in eine Kette von kleinen Kugeln zerfallen. Filamente fand BAKER auch in Osmium-fixierten Schnittpräparaten. Seine Bilder zeigen, daß auch Abschnürungen wie in unserer Abbildung 9 als reine Artefakte entstehen können und nicht ohne weiteres auf intravitale Sprossung oder ähnliches schließen lassen. Ebensolche Protrusionen und Abschnürungen wurden auch an Proteusbakterien beobachtet (ABRAM et al.). Unser Versuch mit Mykoplasmen, die mit Aq. dest. behandelt wurden, zeigt nicht nur, daß filamentöse Verformungen durch Hypotonie erzeugt werden können, sondern auch, daß sich solche Formen ohne Schädigung der Filamente aus einer Suspension abzentrifugieren, fixieren und negativkontrastieren lassen. Dieser Befund läßt allerdings keinen Schluß auf das Verhalten eventueller natürlicher Mykoplasmafilamente zu, deren Fragilität in phasenkontrastmikroskopischen Untersuchungen beobachtet wurde (RAZIN und COSENZA). Weitere Versuche werden klären müssen, ob mit unserer Fixierungsmethode an anderen Wachstumsphasen oder bei anderer Nährbodenzusammensetzung solche Filamente nachgewiesen werden können.

Bläschen und Schläuche, wie sie in unserer Abbildung 10 dargestellt sind, wurden auch von anderen Autoren bei Mykoplasmen beobachtet (ANDERSON und BARILE; NELSON und LYONS). Ähnlich aussehende Bläschen finden sich auf den Abbildungen von BAKER an Erythrocytenfilamenten und auf denen von ABRAM et al. an teilweise zerstörten Proteusbakterien. Auch beim Influenzavirus traten Bläschen mit dem gleichen Erscheinungsbild auf (unveröffentlichte Aufnahmen). Sie trugen keine Spikes, waren also nicht von der intakten Membran umhüllt. Auch die bei Mykoplasmen beobachteten Bläschen zeigten nicht die bei manchen Stämmen so deutlichen Auflagerungen flockulärer Substanz (Abb. 15). Wir beschränken uns bei diesem Stand der Beobachtung auf die Feststellung, daß solche gleichaussehenden Gebilde an völlig verschiedenen Objekten gefunden wurden. Über ihre Bedeutung bei Mykoplasmen können wir keine Angaben machen. Von diesen Bläschen waren echte Mykoplasmaformen der gleichen Größenordnung im PWS-kontrastierten Bild deutlich durch ihre Innen- bzw. Oberflächenstruktur zu unterscheiden (Abb. 15). Solche kleinen Formen, die den vor allem in Schnittpräparaten häufig beobachteten „elementarkörper-ähnlichen“ Gebilden (DOMERMUTH et al.; ANDERSON und BARILE 1965; ANDERSON und MANAKER) entsprechen dürften, fanden wir in größerer Zahl nur beim „Negrioni“-Stamm. Ihre Seltenheit bei den anderen Stämmen läßt sich durch das unterschiedliche physiologische Alter der Kulturen erklären, von dem ihre Häufigkeit nach den Ergebnissen von ANDERSON, POLLOCK und BROWER abhängt. Da sich bei den kompakten Partikeln alle Übergänge von kleinen zu großen Formen (80 bis 750 m μ Durchmesser) fanden, war eine Abgrenzung der „minimal reproductive units“ von anderen Mykoplasmaformen nicht möglich.

Die als „unit membrane“ charakterisierte Membran der Mykoplasmen war nur an defekten Partikeln zu erkennen, in welche PWS eingedrungen war. An solchen Formen waren auch die Auflagerungen jener „flocular substance“ am deutlichsten zu sehen, die von verschiedenen Autoren (DOMERMUTH et al.;

ANDERSON und BARILE 1965; HUMMELER; HUMMELER, TOMASSINI und HAYFLICK) sowohl in Schnitten als auch in negativkontrastierten Präparaten beobachtet wurde. Die Dicke dieser aufgelagerten Schicht war um ein einzelnes Körperchen herum nicht konstant (Abb. 12, 13). Im allgemeinen war die Substanz strukturlos, nur gelegentlich fanden sich Stellen, an denen eine Anordnung in Borsten ähnlich den Influenzavirus-Spikes vermutet werden konnte. Der Unterschied war aber so deutlich, daß uns die Gefahr einer Verwechslung von Mykoplasmapartikeln mit Myxoviren, die wir aufgrund der von HUMMELER an zwei Stellen veröffentlichten Aufnahme befürchteten, nicht gegeben scheint.

Zusammenfassung

Unfixierte Mykoplasmen erschienen im negativkontrastierten Präparat, je nach den Trocknungsbedingungen auf der Objektblende, bizarr und vielgestaltig mit mehr oder weniger langen Filamenten oder abgeplattet mit nur gelegentlichen Ausläufern. Diese verschiedenartigen Formen konnten durch Änderung der PWS-Schichtdicke auf der Blende beliebig erzeugt werden. Im formalinfixierten Präparat aus dem gleichen Ausgangsmaterial waren alle Partikel annähernd rund und ohne Fortsätze.

Nicht nur Filamente, sondern auch Abschnürungen kleiner Partikel konnten künstlich erzeugt werden. Ausstülpungen und Abschnürungen in PWS-kontrastierten Präparaten sind daher nicht ohne weiteres als Sprossungsvorgänge anzusehen.

Die Existenz einer an der Oberfläche von kleinen Mykoplasmenformen beschriebenen „flockulären Substanz“, die bei diesen zu der Bezeichnung „myxoviruslike elementary bodies“ geführt hat, wird bestätigt. Sie findet sich auch an großen Mykoplasmen. Es wird auf Unterschiede zu den Spikes des Influenzavirus hingewiesen.

Summary

Morphological investigations on fixed and unfixed mycoplasmas

K. Reuss, C. Plescher, D. Hülser and K. Herzberg

Several mycoplasma strains from liquid cultures were investigated in PTA-stained and in Pt-shadowed preparations. The shape of unfixed mycoplasmas depended on the drying conditions. Either they showed a bizarre shape being pleomorphic with protrusions and filaments of different length, or they appeared flat with roughly circular outlines and only an occasional filament. These different forms could be produced by varying the thickness of the PTA-layer on the grid. In formalin fixed preparations from the same material all particles were roughly spherical without any filaments.

Even the detachment of small particles from protrusions could be produced artificially. Therefore, micrographs of PTA-stained preparations showing protrusions with adjacent separated particles do not always prove a natural budding process.

The floccular substance which has often been observed before on the surface of small mycoplasma particles (the so-called “myxoviruslike elementary bodies”) was also seen on the surface of large particles. The difference in the appearance of this substance and of influenza virus spikes in negatively stained preparations is demonstrated.

Observations morphologiques de microplasmés fixés ou non fixés

Hallazgos morfológicos en micoplasmas fijadas y no fijadas

Schrifttum

- ABRAM, D., KOFFLER, H., and VATTER, A. E.: Basal structure and attachment of flagella in cells of *Proteus vulgaris*. *J. Bact.* **90**, 1337–1354 (1965).
- ANDERSON, D. R.: Subcellular particles associated with human leukemia as seen with the electron microscope. In: Defendi, V. (Edit.): *Methodological approach to the study of leukemias*. Wistar Inst. Symp. Monograph **4**, 113–141, Wistar Inst. Press, Philadelphia 1965.
- ANDERSON, D. R. and BARILE, M. F.: Ultrastructure of *Mycoplasma hominis*. *J. Bact.* **90**, 180–192 (1965).
- Ultrastructure of *Mycoplasma orale* isolated from patients with leukemia. *J. Nat. Cancer Inst.* **36**, 161–167 (1966).

- ANDERSON, D. R. and MANAKER, R. A.: Electron microscopic studies of Mycoplasma (PPLO strain 880) in artificial medium and in tissue culture. *J. Nat. Cancer Inst.* **36**, 139–154 (1966).
- ANDERSON, D. L., POLLOCK, M. E. and BROWER, L. F.: Morphology of Mycoplasma laidlawii type A. I. Comparison of electron microscopic counts with colony-forming units. *J. Bact.* **90**, 1764–1767 (1965).
- BAKER, R. F.: The fine structure of stromalytic forms produced by osmotic hemolysis of red blood cells. *J. Ultrastruct. Res.* **11**, 494–507 (1964).
- BONAR, R. A., HEINE, U., BEARD, D. and BEARD, J. W.: Virus of avian myeloblastosis (BAI strain A). XXIII. Morphology of virus and comparison with strain R (Erythroblastosis). *J. Nat. Cancer Inst.* **30**, 949–997 (1963).
- BRACK, M.: Mycoplasmosen bei jungen Mährenspringern (*Ammotragus lervia*). *Berliner u. Münch. tierärztl. Wschr.* **79**, 169–172 (1966).
- DIENES, L.: Controversial aspects of the morphology of PPLO. *Ann. NY Acad. Scie.* **79**, 356–368 (1960).
- DMOCHOWSKI, L., TAYLOR, H. G., GREY, C. E., DREYER, D. A., SYKES, J. A., LANGFORD, PH. L., ROGERS, T., SHULLENBERGER, C. C., and HOWE, C. D.: Viruses and mycoplasma (PPLO) in human leukemia. *Cancer* **18** II, 1345–1368 (1965).
- DOMERMUTH, C. H., NIELSEN, M. H., FREUNDT, E. A. and BIRCH-ANDERSEN, A.: Ultrastructure of mycoplasma species. *J. Bact.* **88**, 727–744 (1964).
- FREUNDT, E. A.: The Mycoplasmatataceae (The Pleuropneumonia Group of Organisms). Munksgaard-Copenhagen 1958.
- Morphology and classification of the PPLO. *Ann. NY Acad. Scie.* **79**, 312–325 (1960).
- DE HARVEN, E. and FRIEND, CH.: Structures of virus particles partially purified from the blood of leucemic mice. *Virology* **23**, 119–124 (1964).
- HAYFLICK, L.: Mycoplasmas and human leukemia. In: Defendi, V. (Edit.): Methodological approach to the study of leukemias. *Wistar Inst. Symp. Monograph* **4**, 157–164, Wistar Inst. Press, Philadelphia 1965.
- HOROSZEWICZ: Diskussionsbemerkung in: Defendi, V. (Edit.): Methodological approach to the study of leukemias. *Wistar Inst. Symp. Monograph* **4**, 141–143, Wistar Inst. Press, Philadelphia 1965.
- HUMMELE, K.: Morphology of a mycoplasma isolated from human leukemia (Negrone's agent). In: Defendi, V. (Edit.): Methodological approach to the study of leukemias. *Wistar Inst. Symp. Monograph* **4**, 167–169, Wistar Inst. Press, Philadelphia 1965.
- HUMMELE, K., TOMASSINI, N. and HAYFLICK, L.: Ultrastructure of a mycoplasma (Negrone) isolated from human leukemia. *J. Bact.* **90**, 517–523 (1965).
- KIM, K. S., CLYDE jr., W. A. and DENNY, F. W.: Physical properties of human mycoplasma species. *J. Bact.* **92**, 214–219 (1966).
- KLIENEBERGER-NOBEL, E.: Pleuropneumonia-like organisms (PPLO) Mycoplasmatataceae. Acad. Press, London-New York 1962.
- LIEBERMEISTER, K.: Morphology of the PPLO and L forms of *Proteus*. *Ann. NY Acad. Scie.* **79**, 326–343 (1960).
- NEGRONI, G.: Isolation of viruses from leukemic patients. *Brit. Med. J.* **1964** I, 927–929.
- NELSON, J. B. and LYONS, M. J.: Phase-contrast and electron microscopy of murine strains of Mycoplasma. *J. Bact.* **90**, 1750–1763 (1965).
- RAZIN, S. and COSENZA, B. J.: Growth phases of mycoplasma in liquid media observed with phase-contrast microscope. *J. Bact.* **91**, 858–869 (1966).
- REUSS, K.: The influence of fixation on gross morphology of mycoplasma. *J. Bact.*, im Druck.
- SHARP, D. G., ECKERT, E. A., BEARD, D. and BEARD, J. W.: Morphology of the virus of avian erythromyeloblastic leucosis and a comparison with the agent of newcastle disease. *J. Bact.* **63**, 151–161 (1952).
- ZEIGER, K.: Probleme der Fixation in Licht- und Elektronenmikroskopie. IV. Int. Kongr. Elektronenmikr. **2**, 17–27, Springer-Verlag Berlin – Göttingen – Heidelberg 1960.

Prof. Dr. K. Herzberg und Dr. K. Reuss, 6 Frankfurt am Main, Paul Ehrlich-Straße 40

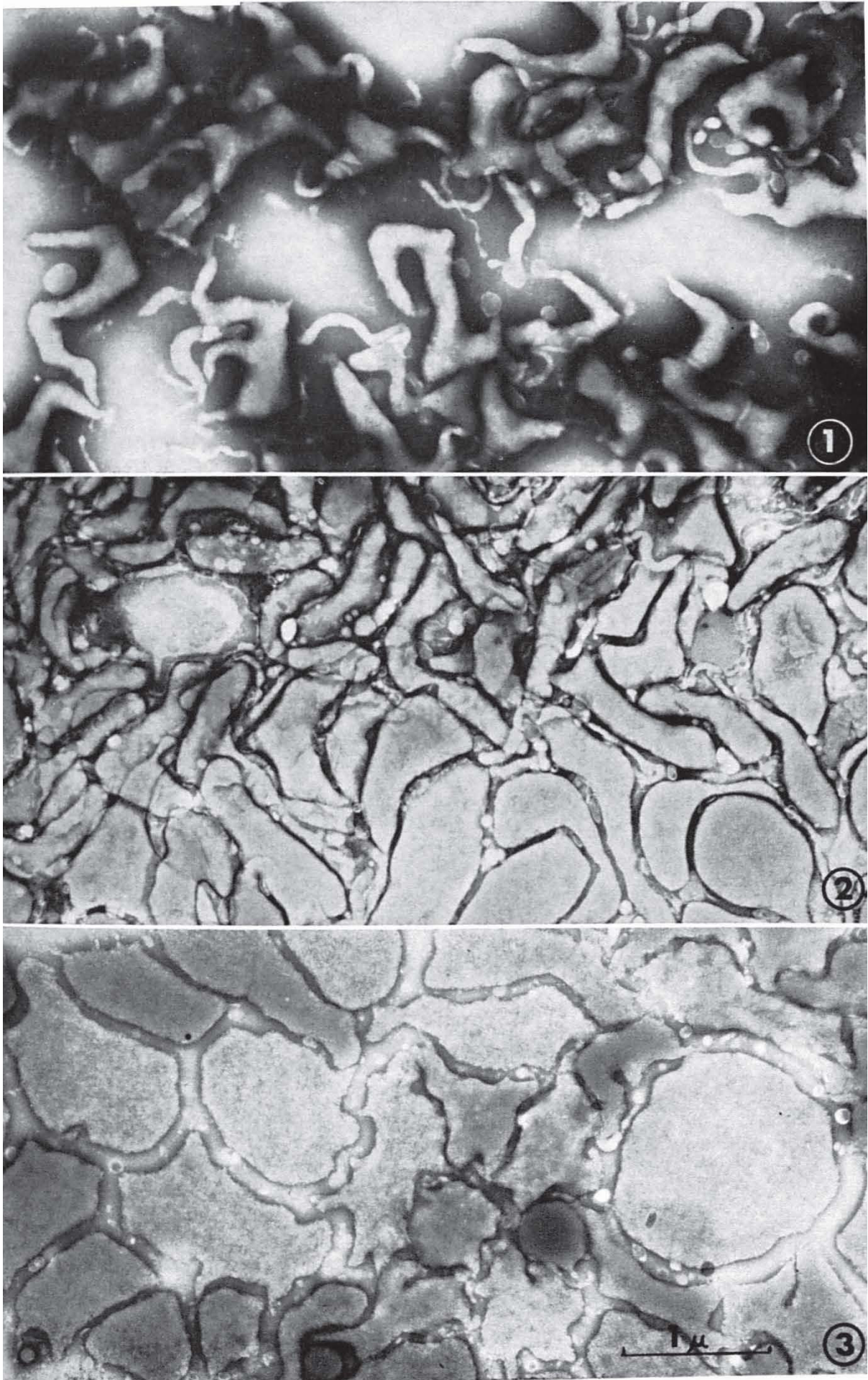
Tafel I

Mykoplasmastamm vom Schaf, unfixiert, negativkontrastiert. Vergrößerung 20000.

Abb. 1. Dicke PWS-Schicht

Abb. 2. Übergangszone

Abb. 3. Dünne PWS-Schicht



Tafel I

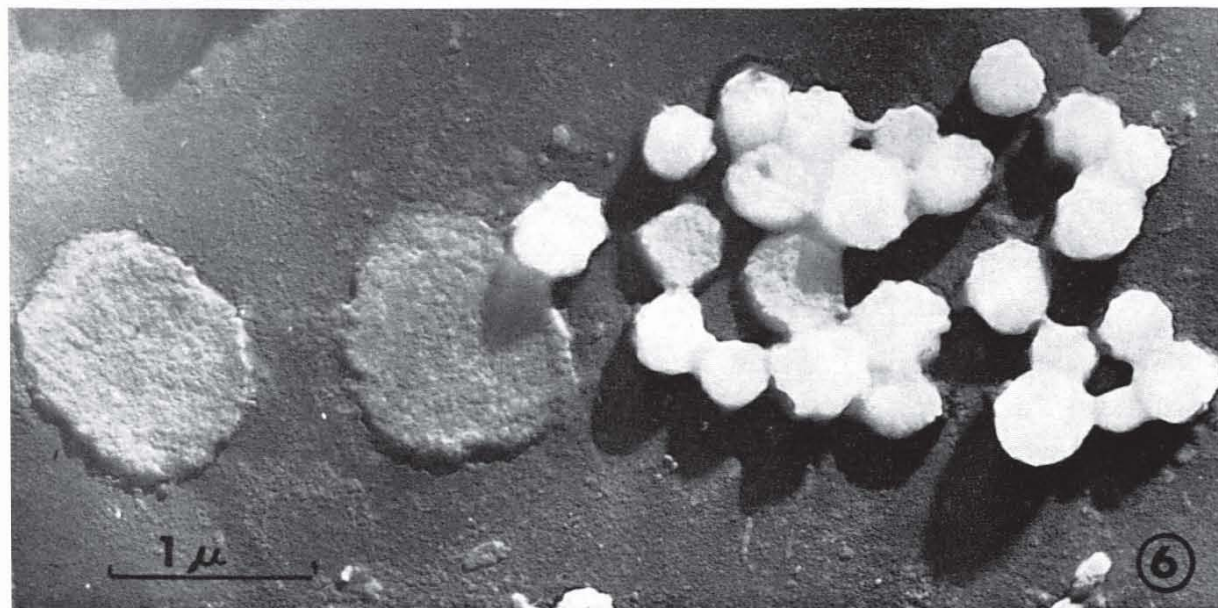
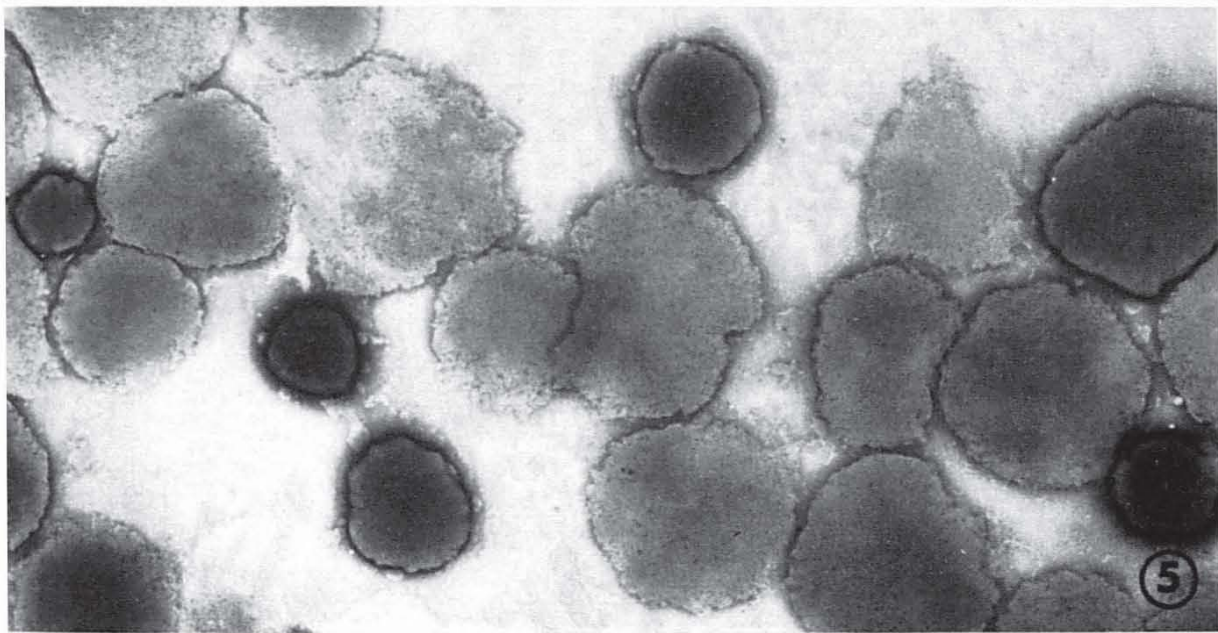
Tafel II

Mykoplasmastamm vom Schaf, mit Formalin fixiert. Vergrößerung 20 000.

Abb. 4. Dicke PWS-Schicht

Abb. 5. Dünne PWS-Schicht

Abb. 6. Schrägbedampft



Tafel II

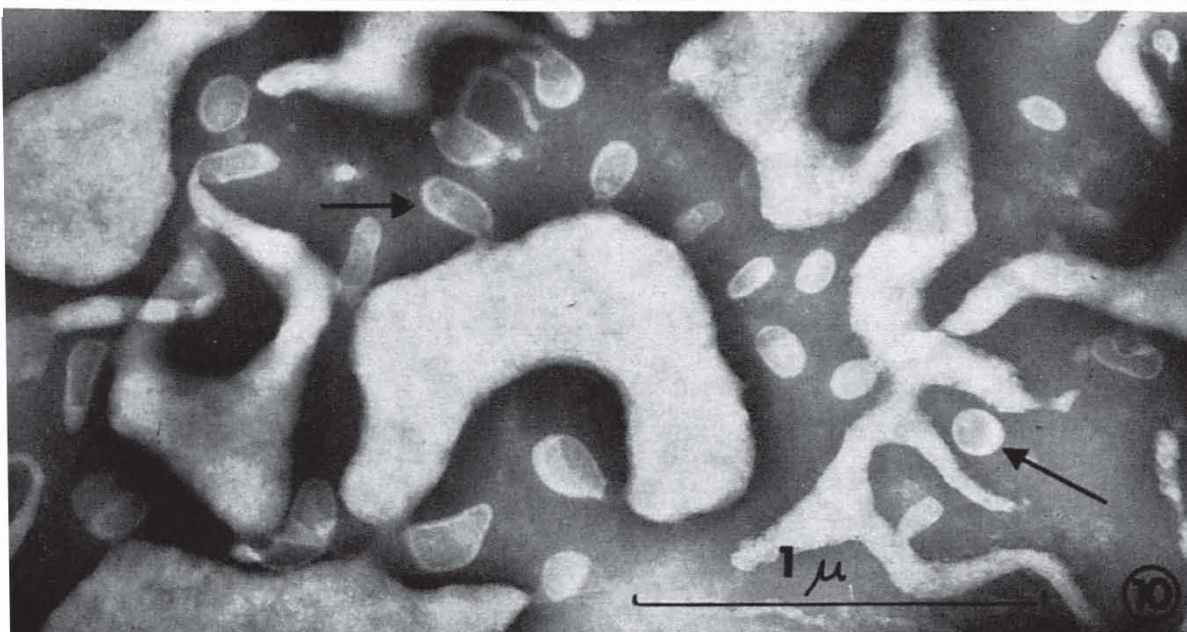
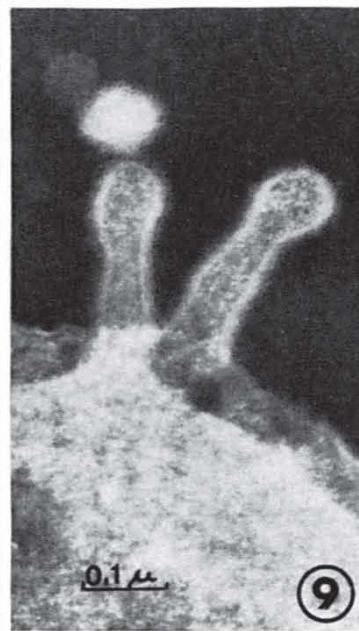
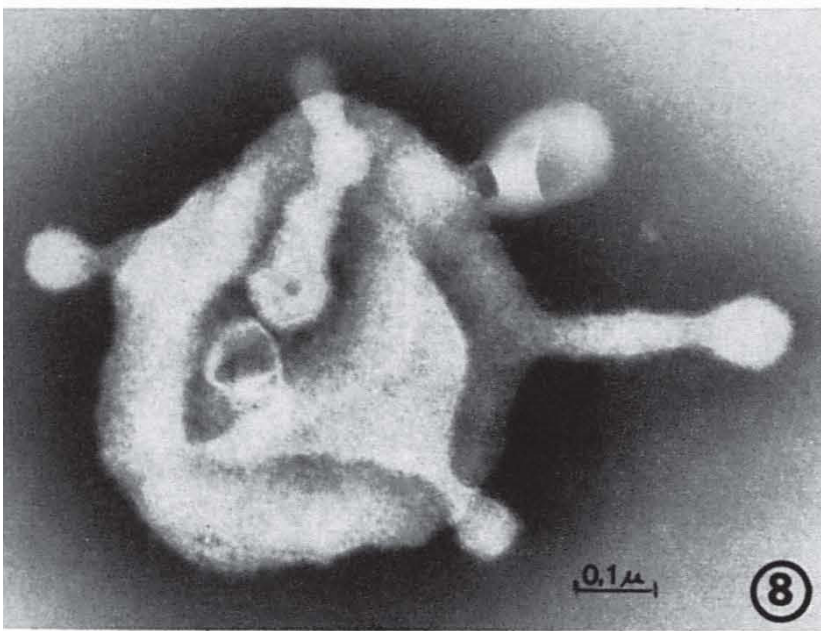
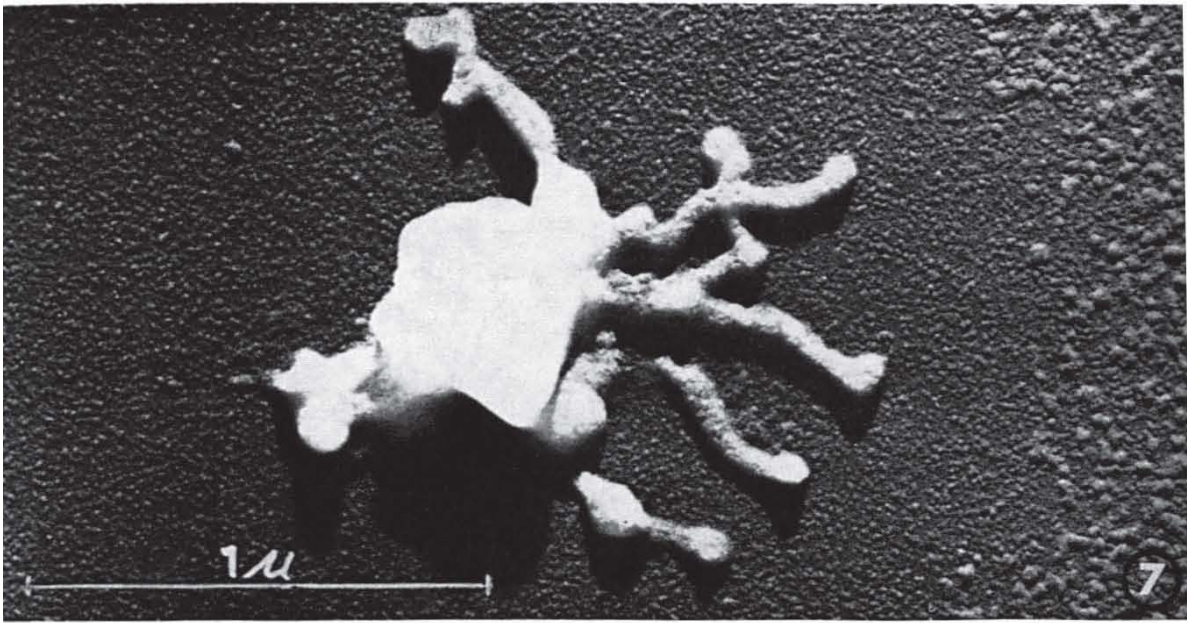
Tafel III

Mykoplasma Stamm „Negroni“.

Abb. 7. Mit Aq. dest. behandelt, formalinfixiert, schrägbedampft. Vergrößerung 45 000.

Abb. 8–9. Mit isotoner Kochsalzlösung behandelt, formalinfixiert, negativkontrastiert
Vergrößerung 80 000.

Abb. 10. Mykoplasma Stamm vom Schaf, unfixiert, negativkontrastiert. Vergr. 40 000.
(„Bläschen“ siehe Pfeile).



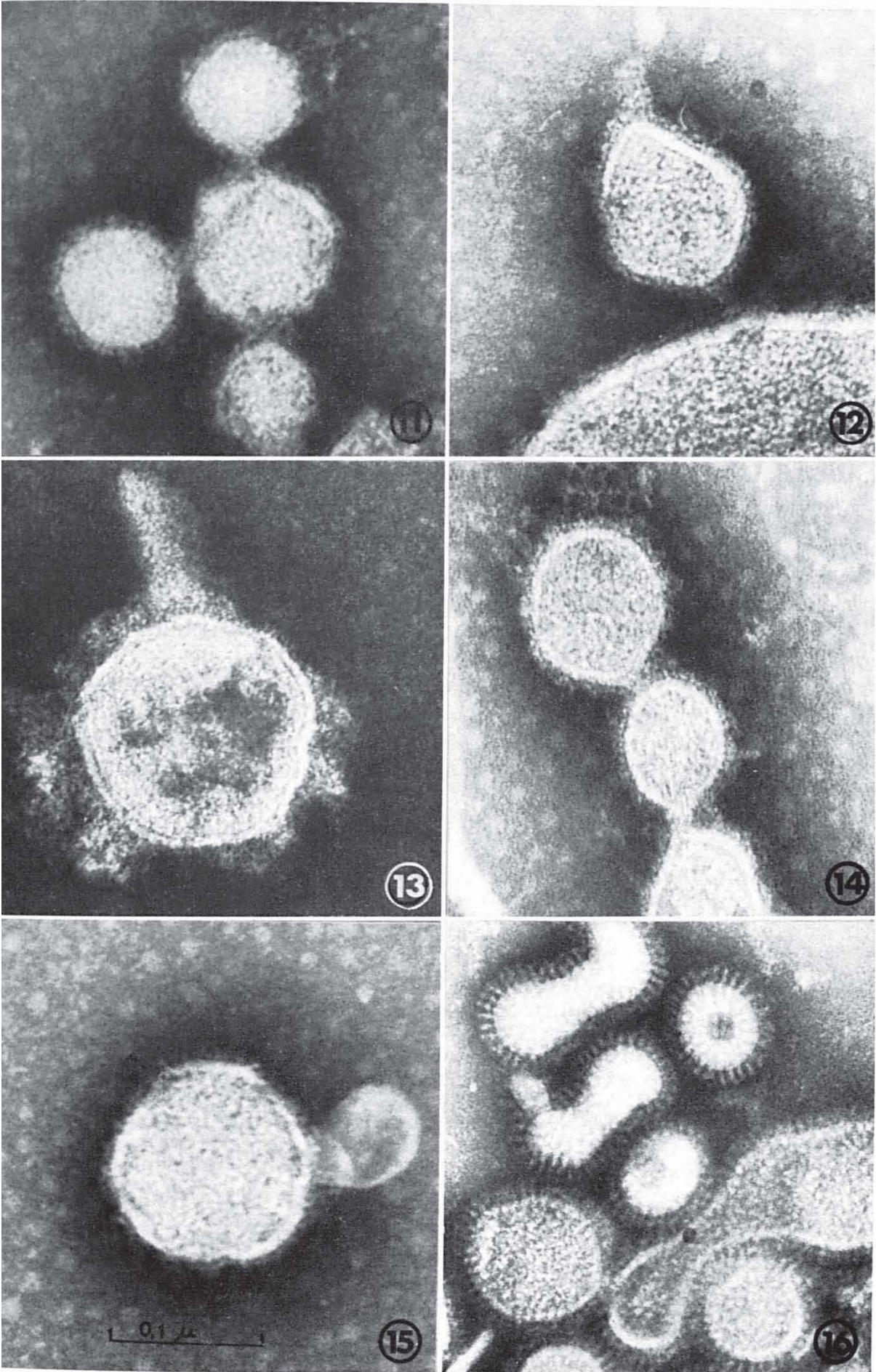
Tafel III

Tafel IV

Gegenüberstellung der „floccular substance“ bei Mykoplasmen und der Spikes bei Influenzavirus.

Abb. 11–15. Mykoplasmastamm „Negroni“ (Linie „Mill Hill“ bzw. „Philadelphia“), formalinfixiert, negativkontrastiert. Vergrößerung 205 000.

Abb. 16. Influenzavirus A₂Asia-Letalstamm, unfixiert, negativkontrastiert. Vergrößerung 205 000.



Tafel IV