

Ein Verfahren zur Anwendung der Agarfixation in der Elektronenmikroskopie*

VON KURT LIEBERMEISTER **

Aus dem Württ. Medizinischen Landesuntersuchungsamt Stuttgart

(Z. Naturforschg. 8 b, 755—757 [1953]; eingegangen am 3. August 1953)

Es wird ein Verfahren beschrieben, das die Anwendung der Agarfixation sowie anderer Präparationsmaßnahmen auf Kollodiumfilm, dem Objektträger der Elektronenmikroskopie, erlaubt. Eine brauchbare elektronenmikroskopische Abbildung eines so leicht deformierbaren und fragilen Keimes, wie des Erregers der Lungenseuche der Rinder (*Pleuropneumonia bovis*), wird dadurch möglich.

Bei Untersuchungen über die Morphologie des filtrierbaren, zur Pleuropneumonia-Gruppe gehörenden Erregers der Lungenseuche der Rinder war mit dem Elektronenmikroskop nach üblicher Präparation keine befriedigende Abbildung der Keime zu erreichen. Lediglich amorphe Massen und undeutlich begrenzte Partikel von sehr unterschiedlicher Massendichte, häufig durch strang- und fadenförmige Gebilde miteinander verbunden, konnten sichtbar gemacht werden (Abb. 1 ***).

Im Gegensatz dazu ließen lichtmikroskopische Vergleiche mit der Phasenkontrasteinrichtung den Erreger im lebenden Zustand durchweg als geformte, mehr oder weniger kugelige, scheiben- oder bläschenartige Organismen von unterschiedlicher Größe erkennen (Abb. 2). Ganz gleichsinnige Ergebnisse lieferte die Anwendung der Agarfixationsmethode (Abb. 3); die Agarfixation¹ und die direkte Agarmikroskopie mit oder ohne Färbung^{2, 3} müssen als Methoden der Wahl zum lichtmikroskopischen Studium dieser Organismen bezeichnet werden.

Auf Grund vergleichender lichtoptischer Untersuchungen wurden die ungewöhnlichen, anfänglich bei den elektronenoptischen Abbildungsversuchen erhaltenen Formen als Präparationseffekte durch Antrocknung der Keime auf den Objektträgerfilm aufgefaßt und deshalb der Trocknungsvorgang einer auf dem Kollodiumfilm eines elektronenmikroskopischen Objektträgers (Netzblende) aufgetragenen Keimsuspension phasenkontrastmikroskopisch mit dem starken Trockensystem beobachtet. Die einzelnen,

zwischen den Maschen der Netzblende in der Flüssigkeit liegenden Bläschen waren deutlich zu erkennen, und im Moment des Sich-zurückziehens des Flüssigkeitsrandes während des Trocknens konnte man sehen, wie die Bläschen offenbar infolge ihrer Oberflächenbeschaffenheit durch eine momentane Änderung der Druckverhältnisse und die wirksamwerdenden Kräfte der Oberflächenspannung zerstört wurden. Dort, wo eben in feuchtem Zustand die einzelnen runden bläschenförmigen Zellen klar und deutlich sichtbar gelegen hatten, war nach der Trocknung nur noch amorpher Zelldetritus übriggeblieben. Der Trocknungsprozeß führt also eine tiefgreifende Änderung des morphologischen Bildes herbei.

Die Elektronenmikroskopie schließt nun bekanntlich eine Beobachtung der Objekte in feuchtem Zustand aus; andererseits konnte man auf die elektronenoptische Methode nicht verzichten, da es wahrscheinlich war, daß lichtmikroskopisch infolge des geringeren Auflösungsvermögens manches morphologische Detail des Erregers verborgen blieb.

Aus diesem Grunde wurde ein Verfahren ausgearbeitet, das auch auf dem elektronenmikroskopischen Objektträgerfilm das Auflegen eines Agarblocks und die Einwirkung und Auswaschung eines Fixierungsmittels zuläßt und somit eine Fixation der Mikroorganismen noch in feuchtem Zustand direkt von der Agaroberfläche auf den gegenüberliegenden Film ermöglicht. Das Prinzip dieses Vorgehens besteht darin, daß man gelöstes Kollodium auf einem Deckglas in

¹ E. Klieneberger, J. Path. Bacteriol. 39, 409 [1934]. E. Klieneberger u. J. Smiles, J. of Hyg. 42, 110 [1942].

² J. Ørskov, Ann. Inst. Pasteur 41, 413 [1927]; Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 141, 229 [1938]; Acta Path. mikrobiol. scand. 19, 586 [1942].

³ L. Dienes, J. Bacteriol. 50, 441 [1945].

* Nach einem Vortrag auf der 2. Tagung der Dtsch. Gesellschaft für Elektronenmikroskopie in Bad Soden, April 1950 (s. a. Optik 7, 310 [1950]).

** Jetzige Anschrift des Verfassers: Hygienisches Institut der Universität Frankfurt a. M., Paul-Ehrlich-Str. 40.

*** Abb. 1, 2, 3 u. 5, s. Tafel S. 756 a.

der für elektronenmikroskopische Untersuchungen notwendigen Dicke antrocknen läßt. Der sich nach Verdunsten des Lösungsmittels bildende Film haftet am Glas und besitzt damit praktisch die gleiche Stabilität wie seine Unterlage. Es lassen sich dann mit dem gleichmäßig vom Film überzogenen Deckglas alle denkbaren Manipulationen eines Präparationsverfahrens, wie z. B. Fixierung, Färbungen und Entfärbungen, Markierungen u. dergl., durchführen. Nach Abschluß der Präparation wird der fest am Glas haftende Film durch fortgesetztes, vom Rande her beginnendes Eintauchen des Deckglases in Wasser langsam mehr und mehr abgelöst und auf diese Weise auf der Wasseroberfläche zum Schwimmen gebracht. Eine geeignete Stelle wird dann mit 1 oder 2 Netzblenden aufgefangen, die unter dem Wasserspiegel von einem Deckglas getragen werden. Den Teil des Films, der nicht auf den Netzblenden selbst zu liegen kommt und dort antrocknet, sondern auf dem Deckglas, das die Netzblenden trägt, kann man ungefärbt oder nach Giemsa-Färbung lichtmikroskopisch untersuchen. Denn es ist stets wertvoll und manchmal sogar unerlässlich, daß man bei lichtmikroskopisch noch sichtbaren Erregern die elektronenmikroskopische Untersuchung mit lichtmikroskopischen koppelt. Wäre dieser Grundsatz stets befolgt worden, so wäre manche irriige Deutung von elektronenmikroskopischen Abbildungen unterblieben.

In Kombination mit der Agarfixationsmethode ergibt sich dann im einzelnen folgendes Verfahren:

Mit Chromschwefelsäure gereinigte Deckgläser werden in 0,5-proz. Kollodiumlösung getaucht (oder auch nur einseitig damit begossen) und senkrecht zum Trocknen gestellt. Die überschüssige Kollodiumlösung läuft ab, der Rest trocknet ein, und zwar am unteren Rand des Deckglases in etwas größerer Dicke. Diese Stelle ist kenntlich und wird bei der Präparation nicht benützt. Die Deckgläser, die auf diese Weise allseits mit einem dünnen, fest angetrockneten Film überzogen sind, können in einer Schale beliebig lang aufbewahrt werden. Bei Bedarf wird ein derart kollodioniertes, auf einem Objektträger liegendes Deckglas seitlich mit 2 weiteren normalen, d. h. nicht präparierten Deckgläsern bedeckt, so daß in der Mitte mehr als ein Drittel der Filmfläche frei bleibt. Ein kleiner Agarblock, der mit dem Messer aus einer Agarplatte herausgeschnitten worden ist und dessen Oberfläche die zu untersuchenden Mikroorganismen trägt, wird vorsichtig mit der Schichtseite nach unten auf die beiden als Stütze dienenden seitlichen Deckgläser gebracht, so daß er dann durch diese etwas abgestützt über dem befilmten ersten Deckglas liegt (Abb. 4a). Bleibt unter dem Agarblock ein minimales Lumen frei, so kann man durch vorsichtiges Andrücken leicht erreichen, daß die Kolonien ohne jede seitliche Verschiebung mit der Filmoberfläche

in Berührung kommen. Man kann auch, steriles Arbeiten vorausgesetzt, einen beimpften, aber nod. nicht bewachsenen Agarblock auf das befilmte Deckglas legen, in einer feuchten Kammer bebrüten und so die Organismen direkt zwischen Agar und Film wachsen lassen.

Zur Fixierung werden dann von oben her langsam nacheinander 2—3 Tropfen Bouinsche Lösung auf den Agarblock gebracht, wie dies auch sonst bei der Agarfixation üblich ist, und die gesamte Präparation wird über Nacht in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Die Bouinsche Lösung diffundiert durch den Agar und fixiert die Mikroorganismen auf den Kollodiumfilm. Der Agar wird dann mit einem Messer oder dergl. vorsichtig abgeschleudert und das darunterliegende Deckglas wird sofort, d. h. bevor es trocken geworden ist, ausgiebig in dest. Wasser gewässert, was durch 1-stdg. Schwimmenlassen des Deckglases mit der präparierten Schichtseite nach unten auf einer Wasseroberfläche geschieht. Nach dieser Zeit hat sich der Film von der nicht mit Keimen

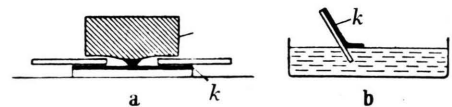


Abb. 4. a) Agarblock mit Kolonie auf dem Kollodium-Deckglasfilm (k), b) Ablösen der Kollodiumhaut (k) vom Deckglas.

beschiedenen Seite des Deckglases, die oben liegt, so weit gelöst, daß er abgewischt und verworfen werden kann. Durch Entlangschaben mit einem scharfen Gegenstand am Rand des Deckglases wird auch der Film, auf dem die Keime fixiert worden sind, mobilisiert und durch mehrmaliges vorsichtiges schräges Eintauchen in Wasser langsam vom Glas gelöst (Abb. 4b). Sollte beim Abschwemmen ein abgelöstes Stück des Films unter Wasser gelangen und dort flottieren, so kann man den Film mit einem anderen Deckglas wieder auffangen, aus dem Wasser nehmen und durch erneutes Abschwemmen auf der Wasseroberfläche ausgebreitet in der richtigen Lage zum Schwimmen bringen. Schwimmt dann der Film oder ein Stück davon auf der Wasseroberfläche, so wird es mit einer Netzblende, die am besten auf einem Deckglas oder, falls die übrigen Teile des Films nicht mehr benötigt werden, auf einem Drahtgitter liegt, von unten her aufgefangen. Die Verwendung von Netzen als Objektträger ist bei diesem Verfahren unbedingt erforderlich, um bei der mikroskopischen Betrachtung genügend viele Felder zur Auswahl zu haben. Den über den Netzblenden gespannten Film läßt man nach Absaugen des überschüssigen Wassers mit einem Fließpapier lufttrocknen und führt anschließend eine Vorprüfung der Präparate im Lichtmikroskop durch.

Die mit dieser Methode zu erzielenden Ergebnisse sind aus Abb. 5 ersichtlich. Nicht jede Präparation gelingt, und Eiweißniederschläge oder Reste des Fixierungsmittels, die auf dem Film haften, können alle

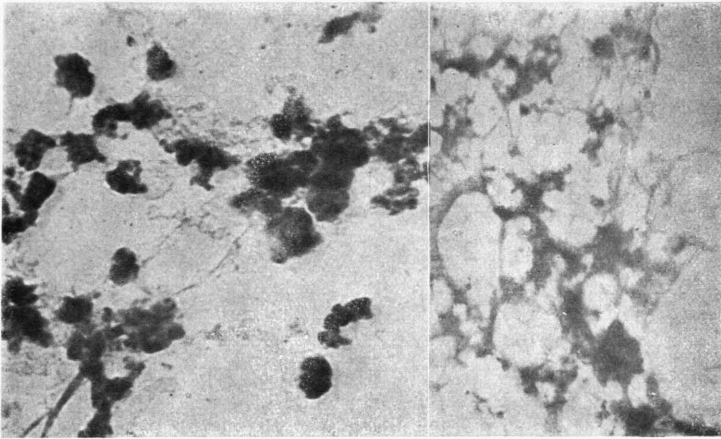


Abb. 1.

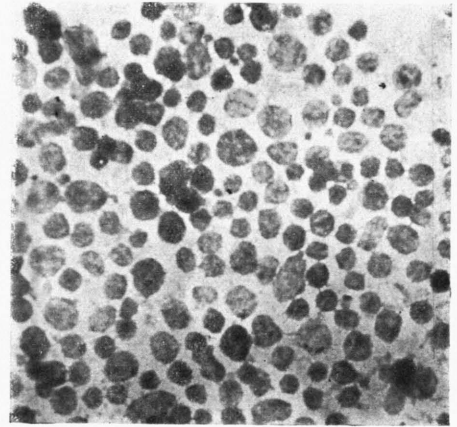


Abb. 5.

Abb. 1 Pleuropneumonie-Erreger aus 48-stdg. Serumbouillonkultur, auf Kollodiumfilm aufgetrocknet; elektronenmikroskopisch, links 10 000-fach, rechts 5 000-fach. Amorpher Zelldetritus, Faden- und Strangbildung.

Abb. 5 Pleuropneumonie-Erreger aus 48-stdg. Kultur auf Serumagar mit Agarfixation auf Kollodium-Deckglasfilm präpariert; elektronenmikroskopisch 4 900-fach. Rundliche Erregerteilchen von sehr unterschiedlicher Größe, keine mycelartigen Strukturen.

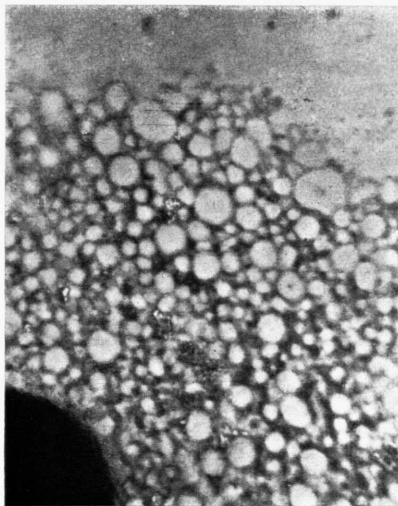


Abb. 2.

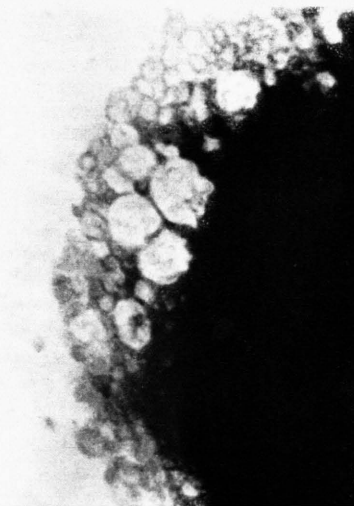


Abb. 3.

Abb. 2 Pleuropneumonie-Erreger, Kolonierand nach 48-stdg. Wachstum auf Serumagar, Lebendbeobachtung; lichtmikroskopisch 900-fach, Phasenkontrasteinrichtung Zeiß-Winkel, Ölimmersion, Objektiv 90, Okular 6×. Schaumartige Struktur des Kolonierandes; neben kontrastreichen kokkoiden Formen zahlreiche, z. T. sehr große kontrastarme „Löcher“.

Abb. 3 Pleuropneumonie-Erreger, Kolonierand nach 48-stdg. Wachstum auf Serumagar, Methylenblaufärbung; lichtmikroskopisch 900-fach. Ölimmersion, Objektiv 90, Okular 6×. Sonst wie Abb. 2.

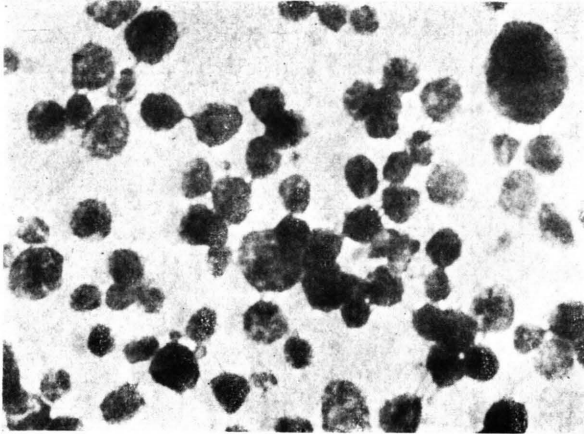


Abb. 1. Pleuropneumonie-Erreger; 48-stdg. Kultur auf Serumagar; Agarfixation auf elektronenmikroskopischen Objektträgerfilm; elektronenmikroskopisch 8400-fach. Normalform, starke Größenunterschiede der einzelnen Erregerteilchen (weitere Ausführungen siehe jeweils Text).

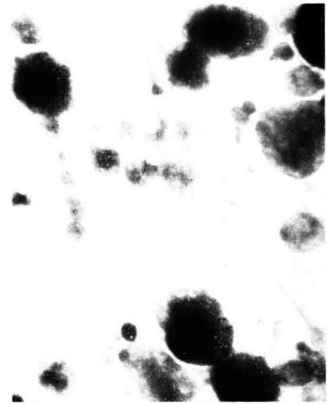


Abb. 3.

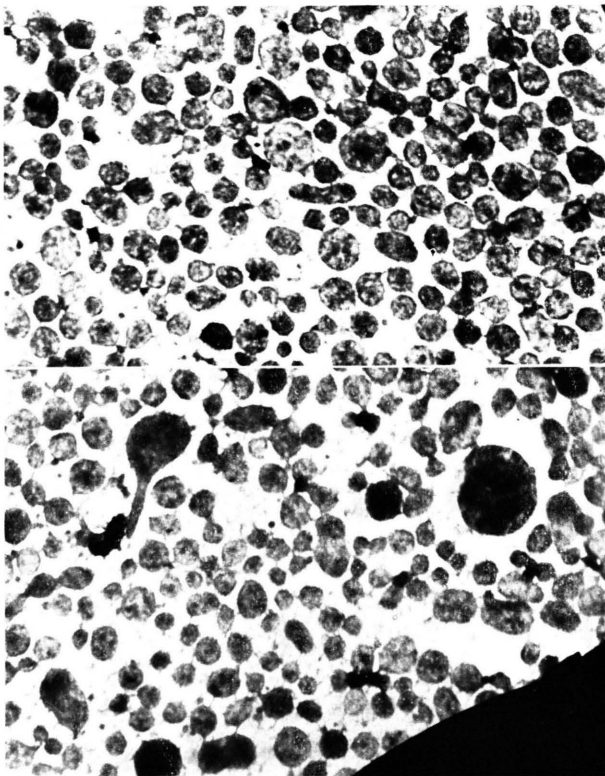
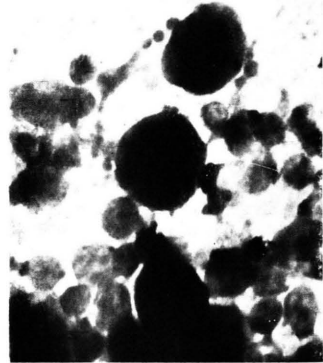


Abb. 2. Wie Abb. 1; elektronenmikroskopisch 5000-fach.

Abb. 3. Wie Abb. 1; elektronenmikroskopisch 10 000-fach. Kleinste Erregerteilchen neben großen, kontrastreichen Organismen.

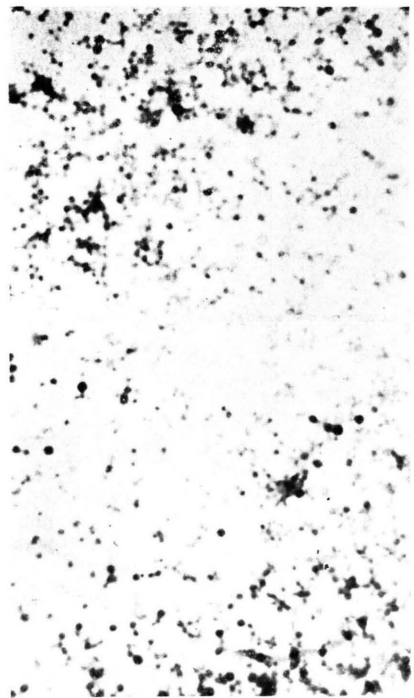


Abb. 4. Gleiches Präparat und gleicher Objektträgerfilm wie Abb. 1 und 2; Giemsa-Färbung; Panphot, Objektiv 1/16 Fl., Okular periplan 8-fach, Vergr. 1500-fach. Normalform, Erregerteilchen verschieden groß, unterschiedlich anfärbbar.

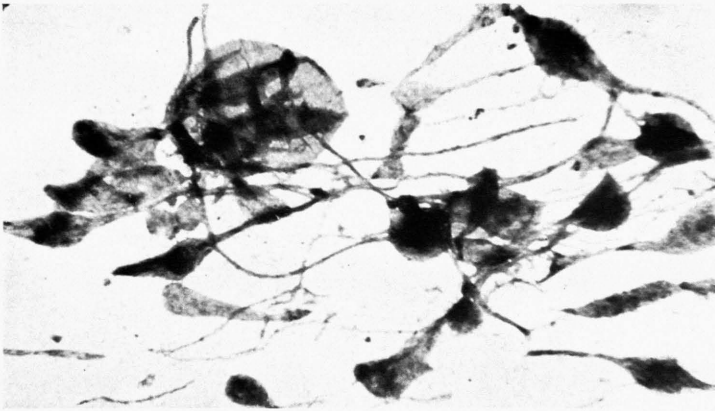


Abb. 5. Pleuropneumonie-Erreger; 48-stdg. Kultur auf Serumagar; Agarfixation auf elektronenmikroskopischen Objektträgerfilm; elektronenmikroskopisch 9000-fach. Dünne, bizarre und verzweigte Fadenformen, teils mit kontrastreichen end- oder mittelständigen Verdickungen und unregelmäßigen Anschwellungen: Durch äußere Einflüsse verursachte Kunstprodukte vor der Fixierung. Kein Anhalt für das Vorhandensein einer membranartigen Zellhülle.

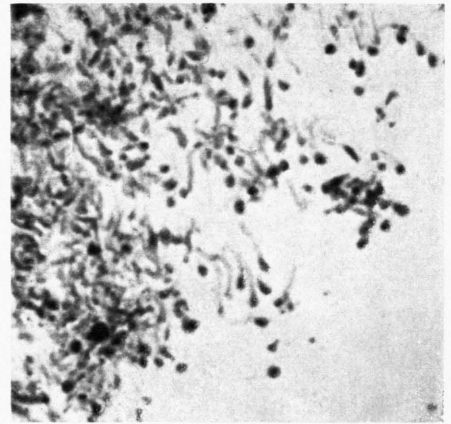


Abb. 7. Gleiches Präparat und gleicher Objektträgerfilm wie Abb. 5 und 6; Giemsa-färbung; Panphot, Objektiv 1/16 Fl., Okular periplan 8-fach; Vergr. 1500-fach. Spermatozoen- und protozoenartige Formen.

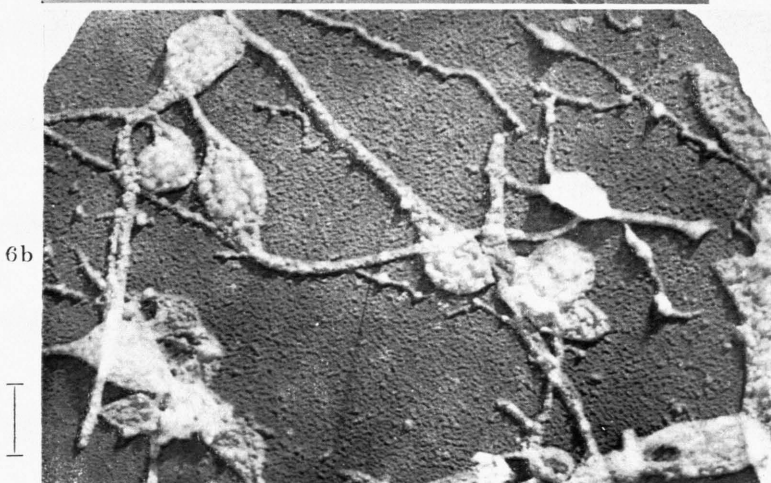
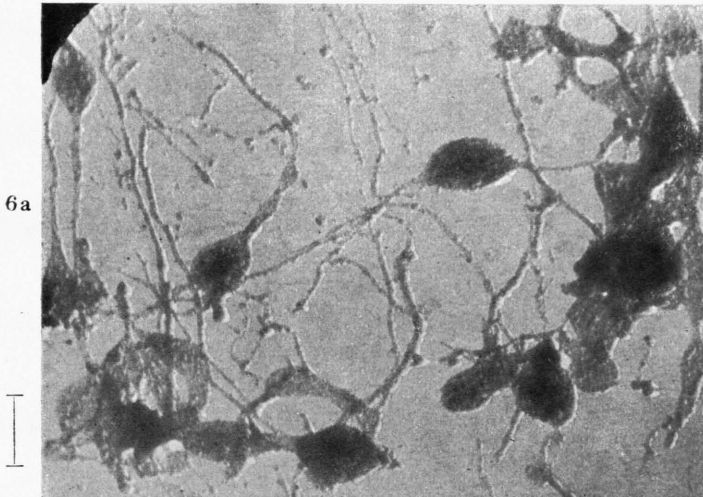


Abb. 6a und b. Wie Abb. 5; elektronenmikroskopisch 10 000-fach; schrägbedampft. Abb. 6a. Direktcopie des Negativs.

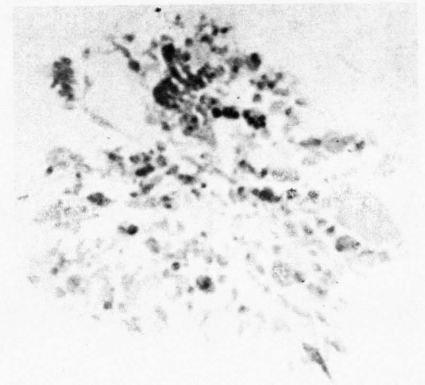


Abb. 8. Pleuropneumonie-Erreger; 48-stdg. Kultur auf Serumagar; Abdruckpräparat einer Mikrokultur auf Glasobjektträger; Osmiumfixierung; Giemsa-färbung; Panphot, Objektiv 1/16 Fl., Okular periplan 8-fach; Vergr. 1500-fach. Fädige polygonale Gebilde verschiedenster Form und Größe, z. T. dunkel rotviolett, z. T. schwach blaß-bläulich gefärbt; Kunstprodukt durch Druck u. Sog.

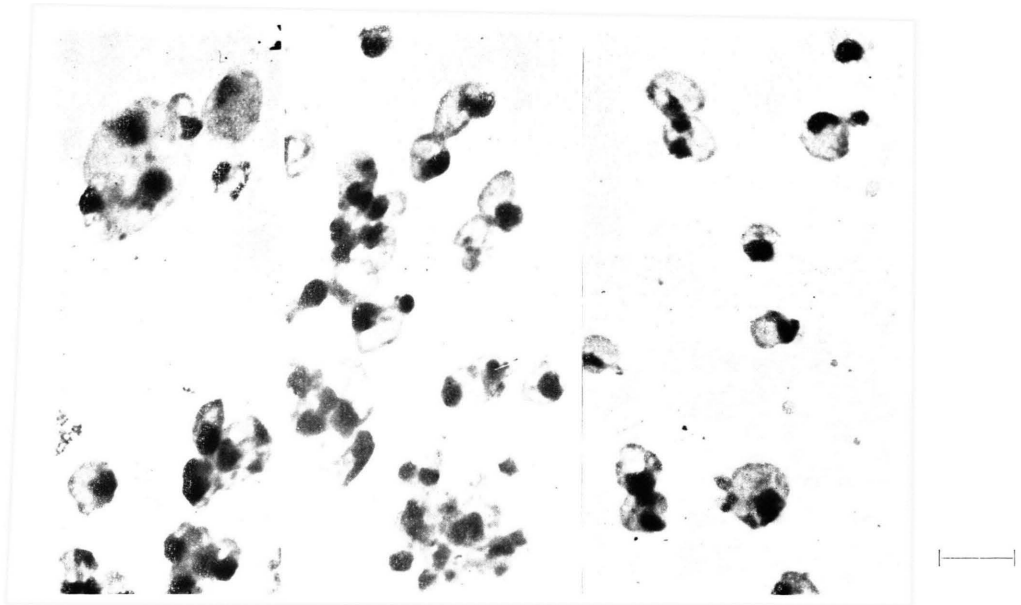


Abb. 10. Saprophytäre PPLO (L₁-Seiffert); aus Serumbouillon nach 30-tägiger Bebrütung bei 20°; Sediment aufgenommen in dest. Wasser und auf Film angetrocknet; elektronenmikroskopisch 10 000-fach. Deutlich erkennbare Zellhüllen; 1 oder 2 große punktförmige Verdichtungen in den sonst weitgehend leeren Bläschen.

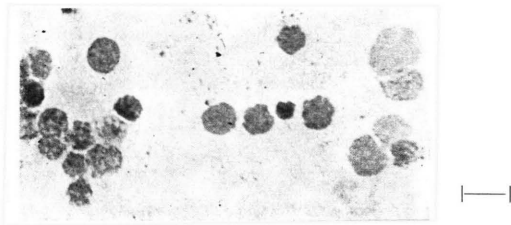


Abb. 9. Saprophytäre PPLO (L₁-Seiffert); aus Serumbouillon nach 8-tägigem Wachstum bei 20°; Sediment aufgenommen in dest. Wasser und auf Film angetrocknet; elektronenmikroskopisch 7000-fach. Ziemlich homogene, mäßig kontrastreiche Scheibchen.

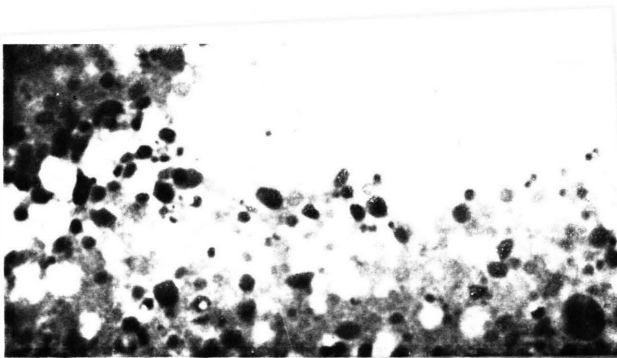


Abb. 12. Saprophytäre PPLO (B-Laidlaw-Elford); 48-stdg. Kultur auf Serumagar; Agarfixation; Giemsa-Färbung; Panphot. Objektiv 1/16 Fl., Okular periplan 8-fach; Vergr. 1500-fach. Kolonierand; neben Blasenformen, sehr verschiedener Größe und Anfärbbarkeit, lochartige freie Stellen.

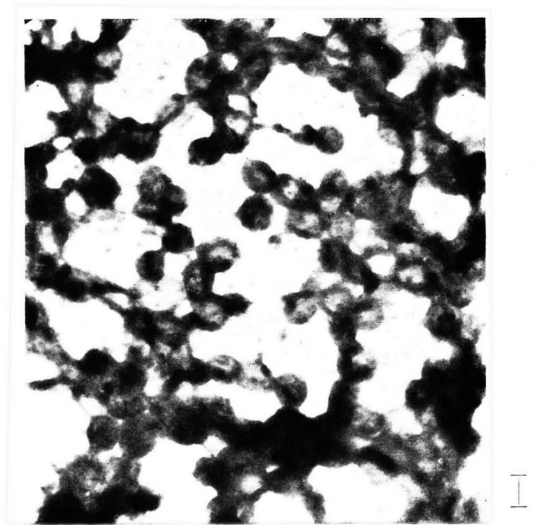


Abb. 11. Saprophytäre PPLO (A-Laidlaw-Elford); 48-stdg. Kultur auf Serumagar; Agarfixation auf elektronenmikroskopischen Objektträgerfilm; elektronenmikroskopisch 5000-fach. Formen mit häufig ringförmig verdickter Randzone und unsymmetrischen Eindellungen.

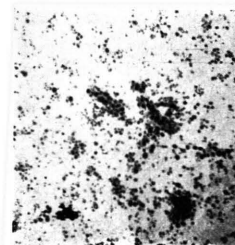


Abb. 13. Saprophytäre PPLO (B-Laidlaw-Elford); 48-stdg. Kultur auf Serumagar; nach Entnahme mit Öse auf Objektträger aufgetrocknet; Giemsa-Färbung; Panphot. Objektiv 1/16 Fl., Okular periplan 8-fach; Vergr. 1000-fach. Unterschiedlich angefarbte und verschieden große Organismen.

Arbeit und Mühe zunichte machen. Es gelingt aber immerhin, eine ausreichende Anzahl brauchbarer Präparate zu erhalten.

Die früheren elektronenmikroskopischen Abbildungen des Pleuropneumonie-Erregers bzw. von zur gleichen Gruppe gehörenden Keimen menschlicher oder tierischer Herkunft (Weiß⁴, Ruska, Poppe und Kausche⁵, Smith, Hillier und Mudd⁶) kamen durchweg nach Präparierungen in der üblichen Weise (Auftrocknenlassen einer Keimsuspension auf dem Kollodiumfilm) zustande. Sie entsprechen deshalb auch dem in Abb. 1 gezeigten Ergebnis. Die von den Autoren z. T. abgebildeten Faden- und Strangformen sind Kunstprodukte der Präparation. Die charakteristische Fragilität und Deformierbarkeit des Erregers sind die Ursachen der Schwierigkeiten bei den morphologischen Studien. Lediglich die eben-

⁴ L. J. Weiß, J. Bacteriol. 47, 523 [1944].

⁵ H. Ruska, K. Poppe u. G. A. Kausche, Z. Hyg. Infektionskrankh. 127, 201 [1947].

⁶ W. E. Smith, J. Hillier u. S. Mudd, J. Bacteriol. 56, 589 [1948].

⁷ K. Liebermeister, 1. Tag. d. Dtsch. Gesellsch. f. Elektronenmikroskopie, Mosbach (Baden), 1949, Vortrag.

falls zu den „pleuropneumonia-like organisms“ (PPLO) zählenden saprophytischen Seiffertschen Mikroorganismen und Laidlaw-Elford'schen Abwasserorganismen konnten unter Erhaltung ihrer charakteristischen morphologischen Eigenschaften mit den üblichen Methoden als Bläschen erkennbar abgebildet werden (Ruska, Poppe und Kausche⁵, Liebermeister⁷). Auf diese Ausnahme wie auch auf die nähere Beschreibung der Morphologie der PPLO wird in einer folgenden Arbeit eingegangen.

Außer dem hier beschriebenen Verfahren kommt zu einer formgetreuen elektronenmikroskopischen Abbildung von PPLO und L-Organismen lediglich die von Kellenberger⁸ inaugurierte Methode der Agarfiltration oder die Methode von Anderson⁹ in Betracht. Erfahrungen mit diesen jüngsten Verfahren liegen bezüglich der PPLO jedoch noch nicht vor.

⁸ E. Kellenberger, Dtsch. Gesellsch. f. Elektronenmikroskopie, 3. Jahrestag, Hamburg, 18. bis 20. Mai 1951, Vortrag u. Z. wiss. Mikroskop. u. mikroskop. Techn. 60, 408 [1952].

⁹ T. Anderson, Congrès International de Microscopie électronique, Paris, 1950.

Untersuchungen zur Morphologie der Pleuropneumonia-(PPLO-)Gruppe*

VON KURT LIEBERMEISTER**

Aus dem Württ. Medizinischen Landesuntersuchungsamt Stuttgart
und dem Hygienischen Institut der Stadt und Universität Frankfurt a. Main

(Z. Naturforschg. 8 b, 757—766 [1953]; eingegangen am 3. August 1953)

Vergleichend durchgeführte licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen ergeben, daß es sich bei den Keimen der PPLO-Gruppe um stark unterschiedlich große und einheitlich bläschenartige Organismen handelt, die keine Zellmembran nach Art der Bakterien besitzen.

Äußere Einflüsse führen außerordentlich leicht zur Deformierung der Organismen, wobei Fadenformen und mycelähnliche Gebilde entstehen.

Die Laidlaw-Elford'schen und Seiffertschen Organismen unterscheiden sich von den übrigen Stämmen durch Ausbildung einer steiferen Zelloberfläche. Die aufgehellten Formen aus alten Kulturen, die intrazellulär einzelne punktförmige Substanzanhäufungen zeigen, werden als sekundäre und bis zu einem gewissen Grad involutive Zellformen und nicht als notwendiges Stadium im Vermehrungszyklus betrachtet.

Abschließend werden Fragen der Vermehrungsweise, der Nomenklatur und der Klassifizierung besprochen.

Der Erreger der Lungenseuche der Rinder (*Pleuropneumonia bovis contagiosa*), nach dem die Gruppe der pleuropneumonie-artigen Organismen (abgekürzt PPLO = pleuropneumonia-like organisms) ihren Namen hat, ist schon im Jahre 1898 entdeckt (Nocard und Roux) und mehrfach eingehend beschrieben worden. Später wurde eine ganz Reihe gleichartiger

Mikroben, wie der Agalaktie-Erreger, die Mäuse- und Ratten-pathogenen Stämme, die Abwasser-Organismen von Laidlaw-Elford und die Seiffert-

* Teilweise vorgetragen auf der 1. Tagung der Dtsch. Gesellschaft für Elektronenmikroskopie in Mosbach, April 1949.

** Anschrift des Verfassers: Hygienisches Institut der Universität Frankfurt a. M., Paul-Ehrlich-Str. 40.