

4. S. E. Sheppard, Comm. no. 240, *Photographic J.* **65**, 380 (1925).
5. A. Steigmann, *Sci. Ind. fotogr.* [2], **6**, 1—3 (1935).
6. S. E. Sheppard, vgl. 1 und 4.
7. A. Steigmann, *Photogr. Korresp.* **71**, 39—40 (1935).
8. M. Abribat, *Sci. Ind. fotogr.* [2], **12**, 1—7 (1941).
9. Ebenso.
10. A. Steigmann, vgl. 2 und 5.
11. R. Hilschu, R. W. Pohl, *Z. Physik*, **64**, 606 (1930).
12. A. Pinkus u. M. Haugen, *Bull. Soc. chim. Belgique* **45**, 693—716 (1936).
13. S. _____
Kunstdünger u. Leim **30**, 239 (1933).
14. A. Steigmann, *Camera (Luzern)* **1946**, No. 7 150—152.
15. A. Steigmann, *Photographische Ind.* **1927** 676 bis 677.
16. E. Banks, *Eder's Handbuch* Bd. II, 1, 735.
17. G. Kail, *Photographische Ind.* **1931**, 789—793
18. R. Ed. Liesegang, *Photographische Ind.* **1931**, 1143.

*Aus dem Laboratorium für Übermikroskopie der Siemens & Halske A. G.,
in der früheren Reichsforschungsanstalt Insel Riems bei Greifswald.*

Zur Frage der Potenzierung von Bakteriophagenlösungen durch Zerschäumen *) 1)

Von H. Ruska (Berlin-Buch)

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 10. April 1945.)

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung des Vorgangs der bakteriophagen Lyse²⁾ wurden verschiedene Formelemente gefunden, die wir als Träger der lytischen Eigenschaften betrachten. Man sieht je nach den untersuchten Phagenstämmen keulenförmige (Abb. 1), kugel- oder auch stäbchenförmige Gebilde von über 200 μ . Gesamtlänge bis zu Größen von 40 μ . Unserer Auffassung, daß es sich dabei um die Träger der lytischen Eigenschaften handelt, stehen einige Arbeiten gegenüber³⁾, denen zufolge die Partikelgröße des wirksamen Agens bei nur 1 bis 2 μ liegt. Beide Ergebnisse sind nicht miteinander zu vereinen. Bestehende Zweifel haben möglicherweise dazu beigetragen, daß von R. Doerr in der jüngsten Darstellung der Natur der Virusarten⁴⁾ die Frage der Morphologie der Bakteriophagen und der Identität von elektronen-

mikroskopisch sichtbaren Phagenpartikeln und lytisch wirksamem Agens nicht erörtert wurde.

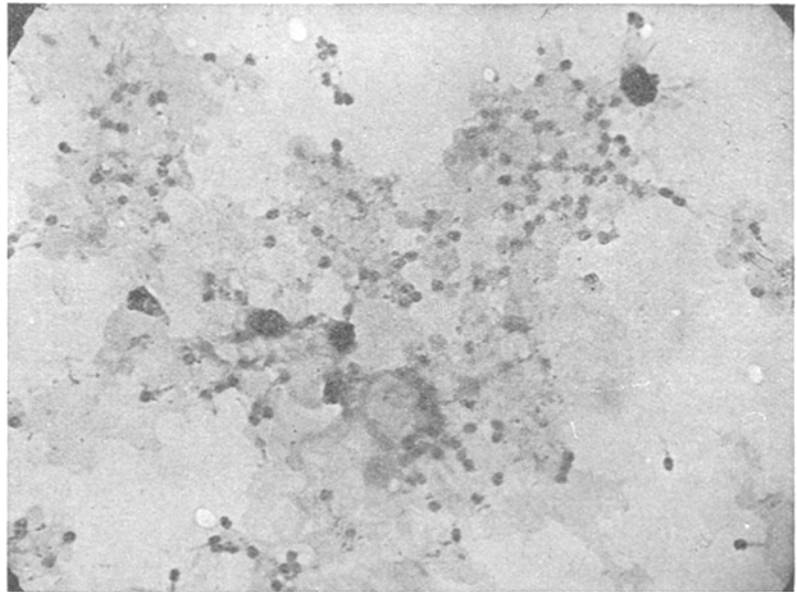


Abb. 1. Phagenaggregat cl. opt. 20000:1.

* Aus technischen Gründen erschien die zweite Mitteilung bereits in *Kolloid-Z.* **110**, Heft 2, S. 103.

1) Erste Mitteilung zum Nachweise der Identität zwischen elektronenmikroskopisch beobachtbaren Phagenpartikeln (d'Herellen) und lytisch wirksamem Agens.

2) H. Ruska, *Naturwiss.* **29**, 367 (1941); *Arch. Virusforsch.* **2**, 345 (1942); *Erg. Hyg.* **25**, 437 (1944). — U. Kottmann, *Arch. Virusforsch.* **2**, 388 (1942). — S. E. Lauria u. T. F. Anderson, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **28**, 127 (1942); *Electronic Engng.* Juli 1943 und *Electrical Rev.* Februar 1944.

3) G. Kalmannson u. J. Bronfenbrenner, *J. gen. Physiol. (Am.)* **23**, 203 (1939). — H. Bloch, *Arch. Virusforsch.* **1**, 560 (1940).

4) R. Doerr, *Handbuch der Virusforschung*, Erg.-Bd. 1 (Wien 1944).

Um den Identitätsnachweis zu führen, muß die Übereinstimmung zwischen der Größe der von uns nach dem Entdecker der bakteriophagen Lyse als d'Herellen bezeichneten sichtbaren Partikel und derjenigen Größe nachgewiesen werden, die sich bei der Ultrafiltration aus dem Filtrationsendpunkt des Lysats ergibt⁵⁾. Ferner muß die Zahl der elektronenmikroskopisch sichtbaren Partikel in Beziehung gesetzt werden zur Zahl der im Titrationsversuch feststellbaren, lytisch wirksamen Einheiten⁶⁾. Zunächst soll jedoch geprüft werden, ob sich der Befund von Bloch³⁾ reproduzieren läßt, demzufolge es

5) Siehe die Mitteilung von H. Ruska und C. Menze, *Kolloid-Z.* **110**, H. 2, 103 (1948).

6) Erscheint später.

Tabelle I. Titrationsreihen der Durchschäumungsversuche.

Lysat- verdünnung	Ausgangslysat			Durchschäumungs- rückstand			Schaumkondensat		
	Phagenstamm			Phagenstamm			Phagenstamm		
	117	128	174	117	128	174	117	128	174
10 ⁻¹ bis 10 ⁻⁴	++++	+++++	++	++++	+++++○++	++	++++	+++++	++
10 ⁻⁵	++++	+++++	++	++++	+++++○++	++	++++	+++++	++
10 ⁻⁶	++++	+++++	++	++++	+++++○+	++	++++	+++++	++
10 ⁻⁷	++++	+++++	++	++++	+++++○	++	++++	+++++	++
10 ⁻⁸	++++	+++++	++	++++	+++○	++	++++	++++	++
10 ⁻⁹	+++	+++	+	+++	+○	++	+++	+++	+
10 ⁻¹⁰	---	---	---	+++	+○	+	+++	---	+
10 ⁻¹¹	---	---	---	+	○	---	---	---	---
10 ⁻¹² bis 10 ⁻¹⁵	---	---	---	---	○	---	---	---	---

+ = vollständige Lyse, — = Bakterienwachstum, ○ = ausgefallener Versuch.

gelingt, Phagenpartikel durch Zerschäumen so zu zerlegen, daß Aktivierungen bis zu 5 Zehnerpotenzen(!) und daraus erschlossene Partikelverkleinerungen von 50 auf 1,1 μ auftreten.

Wir haben uns dazu streng an die Apparatur und die Arbeitsweise von Bloch gehalten, jedoch nicht das Colilysin S, sondern 3 auf den gleichen Typhusstamm 162 einwirkende Typhuslysine von Sertic und Boulgakov⁷⁾ verwendet, deren Partikelgröße uns nach Ultrafiltrationsbestimmungen mit 70—110, 20—30 und 8—12 μ angegeben wurde. Die Phagenstämme tragen die Bezeichnung 117, 128 und 174. Die Lyse erfolgte in den von Sertic und Boulgakov angegebenen Nährmedien mit dem homologen Typhusstamm. In Tabelle I sind die Ergebnisse zusammengestellt. Jede senkrechte Reihe gibt einen Durchschäumungsversuch wieder, wobei die Reihenfolge der Versuche bei den verschiedenen Proben des gleichen Phagenstammes sich jeweils entspricht.

Wir können nach den in Tabelle I zusammengestellten Ergebnissen die Versuche von Bloch in qualitativer Hinsicht zum Teil bestätigen. Es ist in 9 von 15 Versuchen im Durchschäumungsrückstand oder im Schaumkondensat oder in beiden eine Aktivitätssteigerung zu beobachten. In 2 Versuchen ist kein Einfluß der Durchschäumung nachweisbar, in 4 ist sogar eine geringe Titerverminderung eingetreten. Die Aktivitätssteigerungen betragen aber höchstens das 10—100fache, also 0,1—1%(!) der Angaben in den Versuchen von Bloch.

Um sicher zu sein, daß unsere Titerablesungen richtig sind, haben wir bei allen Phagenstämmen in einzelnen Versuchen (2. Reihe bei

Stamm 117, 1., 2. und 6. bei 128 und 2. bei 174) die letzten, durch das Lysat nicht geklärten Kulturröhrchen durch Berkefeld N-Kerzen filtriert und im Filtrat Phagen nachzuweisen versucht. Dabei kam es einmal vor, daß in 3 bis 4 nicht geklärten Röhrchen der Verdünnungsreihe Phagen noch nachweisbar waren, weil das Bakterienwachstum in den Versuchsröhrchen vor dem Phagenzusatz schon etwas weit fortgeschritten war. In diesem Falle reichten also die höchsten Phagenverdünnungen nicht aus, um eine völlige Auflösung der Kultur herbeizuführen. Diese Beobachtung betraf aber das Ausgangslysat ebenso wie den Durchschäumungsrückstand und das Schaumkondensat (174, 2. Reihe). Eine größere Differenz zwischen den verschiedenen Proben als 1 bis höchstens 2 Zehnerpotenzen ließ sich auch hierdurch nicht nachweisen. Die Geringfügigkeit des Durchschäumungseffekts wird besonders deutlich, wenn man die spontan vorkommende Titerstreuung um mindestens 1 Zehnerpotenz berücksichtigt.

Für die Auslegung der Ergebnisse der Durchschäumungsversuche ist der quantitative Unterschied zwischen den Blochschen und unseren Befunden von großer Bedeutung. Bloch hat schon darauf hingewiesen, daß die Aktivitätserhöhung im Schaumkondensat nicht durch die Schaumadsorption erklärt werden kann, weil sich der Titer auch im Durchschäumungsrückstand erhöht. Er hat deshalb angenommen, daß eine Aufspaltung der ursprünglich etwa 50 μ großen Partikel (P) in 1 μ große Teile (p) erfolgt. Er hält die 50 μ großen Partikel für Aggregate. Wir sind dagegen der Auffassung, daß eine solche Spaltung der elektronenmikroskopisch sichtbaren Phagenpartikel (P) wegen ihrer differenzierten Form sehr unwahrscheinlich ist und daß die Potenzierung nicht durch Aufspaltung der etwa 50 μ großen Phagenpartikel,

⁷⁾ V. Sertic u. N. Boulgakov, Cr. Soc. Biol. 119, 1270 (1935). Herrn Dr. Boulgakov, Paris, bin ich für die Überlassung der Stämme sehr zu Dank verpflichtet.

sondern durch Trennung von Aggregaten solcher großer Partikel zustande kommt. Es zerfällt also nicht ein Partikel P in 100000 p, sondern ein Partikelaggregat 100 P in 100 Partikel P. Elektronenmikroskopisch sind entsprechende, durch Bakterienreste zusammengehaltene Anhäufungen von über 100 Phägen oft zu beobachten (Abb. 1). Da nach unseren Versuchen die Potenzierung höchstens das 10—100fache beträgt, steht die Größe der beobachtbaren Aggregate in guter Übereinstimmung mit dem an der Titersteigerung gemessenen Effekt. Nach mir freundlicherweise überlassenen persönlichen Mitteilungen konnten auch G. A. Kausche, E. Weineck und H. Knöll so extreme Aktivitätssteigerungen, wie sie Bloch angibt, nicht nachweisen. Dabei ist besonders bemerkenswert, daß H. Knöll in eingehenden Versuchen unter anderem auch das gleiche Colilysin S verwendet hat, mit dem Bloch seine Versuche durchführte. Er hat nur manchmal eine Steigerung um eine Potenzstufe erhalten.

Um die Umdeutung der Blochschen Versuche zu rechtfertigen, mit der wir die von ihm vermutete Aufspaltung von 50 μ großen Phagen in 1 μ große Stücke ablehnen und dafür umgekehrt annehmen, daß etwa 50 μ große Partikel die unteilbaren Elementarteile von über 100 Teilchen umfassenden Aggregaten dieser Partikel sind, haben wir untersucht, ob sich nach der Durchschäumung der Filtrationsendpunkt eines Lysats ändert. Dieses müßte der Fall sein, wenn tatsächlich 1 μ große Teilchen auftreten würden. Zu diesem Zweck wurde das Lysat 128,

Tabelle II. Zahl der Lysineinheiten pro Kubikzentimeter (Phagenstamm 128) vor und nach Ultrafiltration.

Porendurchmesser in μ	Ausgangslysat		Durchschäumungsrückstand		Schaumkondensat	
	vor	nach	vor	nach	vor	nach
	Ultrafiltration		Ultrafiltration		Ultrafiltration	
150	10^7	10^7	10^7	10^8	10^7	10^7
132	10^8	10^6	10^7	10^7	10^7	10^8
102	10^8	10^7	10^{10}	10^8	10^9	10^8
74	10^8	10^5	10^7	10^5	10^8	10^5
52	10^9	0	10^8	0	10^8	0
40	10^5	0	10^6	0	10^7	0

⁸⁾ Frl. cand. rer. nat. C. Menze, frühere Reichsforschungsanstalt Insel Riems, danke ich für die Überlassung der nach Elford hergestellten und mittels der Wasserdurchfluß-Methode geeichten Gradocol-Membranen.

dessen Partikelgröße der von Bloch angenommenen Größe von 50 μ am nächsten kommt, durch eine Serie von Ultrafiltern⁸⁾ verschiedener Porengröße vor und nach der Durchschäumung filtriert. Die Tabelle 2 zeigt, daß sich durch die Zerschäumung der Filtrationsendpunkt nicht verschoben hat, d. h. daß keine Verkleinerung der Elementarpartikel auftritt.

Dafür, daß die Größe der kleinsten Teile des bakteriophagen Agens mit 1 μ zu gering angenommen ist, sprechen auch die Messungen der statistischen Ultramikrometrie mit Röntgenstrahlen⁹⁾, durch die eine Minimalgröße der wirksamen Partikel erfaßt wird. Bei Phagen, deren Durchmesser mittels Ultrafiltration oder Ultrazentrifugation zu 10—12, 20—40, 80 bis 120 und 100—150 μ ermittelt waren, ergab die Durchmesserbestimmung aus dem formalen Treffvolumen 11, 18, 22 und 2² μ . Auf die Frage, warum hierbei die Übereinstimmung der Meßergebnisse mit der zunehmenden Phagengröße abnimmt, kommen wir in der folgenden Mitteilung zurück.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß wir eine Potenzierung von Phagenlösungen durch Zerschäumen um 1—2 Zehnerpotenzen (0,1 bis 1 ‰ der Blochschen Angaben) nachweisen konnten. Den Durchschäumungseffekt deuten wir als die Folge der Desaggregation von Phagenaggregaten aus Partikeln der bisher als gültig angenommenen und elektronenmikroskopisch sichtbaren Größen; nicht dagegen als Desaggregation oder Aufspaltung der zuletzt genannten Elemente. Das Vorkommen von Phagenaggregaten wird nachgewiesen und gezeigt, daß sich der Filtrationsendpunkt von Lysaten nach der Durchschäumung nicht verschiebt. Damit entfällt eines der wesentlichsten Bedenken gegen die Identität der elektronenmikroskopisch sichtbaren Elemente (d'Herellen) mit dem lytisch wirksamen Agens.

Dem Präsidenten der Forschungsanstalt Insel Riems, Herrn Prof. Dr. Dr. O. Waldmann, sind wir für die gastliche Aufnahme, die das Laboratorium für Übermikroskopie der Siemens & Halske A.G. in der Forschungsanstalt gefunden hatte, sehr zu Dank verpflichtet. Frau M. Gethmann dankt der Verfasser für ihre experimentelle Hilfe.

⁹⁾ K. G. Zimmer, Phys. Z. 1943, 11, 233.—E. Wollmann u. A. Lacarsagne, Ann. Inst. Pasteur 64, 4 (1940).