

The average degree of polymerization was determined by Van Slyke amino nitrogen determinations, and found to be between about 70 and 85, corresponding to average molecular weights between 7000 and 8500.

A more detailed report on the experiments summarized here will be given elsewhere¹.

M. FRANKEL, M. HARNIK, and Y. LEVIN

Department of Organic Chemistry, The Hebrew University, Jerusalem, Israel, December 21, 1951.

Zusammenfassung

Polyaminomalonsäure (VIII), das erste Glied der homologen Poly- α -aminodikarbonsäuren, wurde synthetisiert, ausgehend von Aminomalonsäurediäthylester (I), der mit Chlorameisensäuremethylester in N-Carboxy-thoxy-aminomalonsäure-diäthylester (II) überführt wurde. Aus II wurde der Halbester III dargestellt, der durch Phosphorpentachlorid in das Leuchs-Anhydrid IV verwandelt wurde. Durch Erhitzen im Vakuum auf 90 bis 120° oder durch Stehenlassen in Pyridin wurde aus IV der Polyaminomalonsäureester mit endständiger freier Carboxylgruppe (VI) erhalten, aus dem die freie Polyaminomalonsäure (VIII) mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von 70–85 und einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 7000 bis 8500 gewonnen wurde.

¹ Cf. also thesis submitted to the Senate of the Hebrew University in partial fulfillment of the requirements for the Ph. D. degree by M. HARNIK (April, 1951).

Les nucléoïdes de *Escherichia coli* étudiés à l'aide du microscope électronique¹

Depuis les travaux fondamentaux de BADIAN², de PIEKARSKI³, de STILLE⁴, de NEUMANN⁵ et de ROBINOW⁶, on ne peut mettre en doute l'existence d'un équivalent nucléaire dans les bactéries. Par la réaction de Feulgen, on a pu montrer que ces nucléoïdes sont essentiellement composés d'acide désoxyribonucléique, et TULASNE et VENDRELY⁷ ont apporté une preuve supplémentaire en remplaçant l'hydrolyse par l'action de la ribonucléase.

¹ Ce travail a été soutenu par une subvention de la Fondation Fritz Hoffmann-La Roche pour l'expansion en Suisse du travail scientifique exécuté par équipe.

² J. BADIAN, Arch. Mikrobiol. 4, 409 (1933).

³ G. PIEKARSKI, Arch. Mikrobiol. 8, 428 (1937); Naturwissenschaften 37, 201 (1950).

⁴ B. STILLE, Arch. Mikrobiol. 8, 125 (1937).

⁵ F. NEUMANN, Zbl. Bakt. Parasitenkunde II, 103, 385 (1941).

⁶ C. F. ROBINOW, Proc. Royal Soc. London [B], 130, 299 (1942). Addendum de Dubos *The bacterial Cell* (Harvard Univ. Press).

⁷ R. TULASNE et R. VENDRELY, Nature 160, 225 (1947); C. r. Soc. Biol. 141, 674 (1947).

Ces deux méthodes, à savoir l'hydrolyse et l'action enzymatique ne sont guère utilisables au microscope électronique; elles ne provoquent pas une disparition de matière, mais un changement chimique s'accompagnant d'une différenciation spécifique des propriétés tinctoriales¹.

La méthode de préparation de HILLIER, KNAYSIS et BAKER (H.K.B.)² permet de mettre en évidence des structures analogues à celles obtenues par la méthode hydrolyse-Giemsa ou par le procédé de DE LAMATER³. Les endroits renfermant de l'acide désoxyribonucléique sont représentés par des plages de diffusion électronique plus faible. Dans cette technique, une goutte de suspension bactérienne dans l'eau distillée (avec 0,05% tryptone) est déposée sur une surface d'agar recouverte d'une mince couche de collodion. On retire la goutte, et quelques cellules adhèrent à la surface de la membrane à travers laquelle elles sont nourries. Les cellules qui ont souffert du séjour dans l'eau distillée reprennent leur croissance. De cette façon MUDD, HILLIER, SMITH et BEUTNER⁴ ont pu étudier les bactéries pendant la période latente de leur croissance. Cependant, ce procédé présente deux graves inconvénients: le passage dans l'eau distillée et l'existence possible d'une sélectivité lors de l'adhésion à la membrane.

En collaboration avec GRET KELLENBERGER⁵, nous avons modifié cette méthode en ayant recours au principe de la filtration⁶. La première partie de notre procédé diffère de celui de H.K.B.: des boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé à 1,5% sont légèrement séchées dans une étuve ventilée à 37°. Nous y versons ensuite une solution de parladiol dans de l'acétate d'amyle (0,17 à 0,2%). On transvase cette solution d'une boîte à l'autre, et on laisse évaporer le solvant en les laissant ouvertes, retournées et inclinées pendant une nuit. Le séchage préalable rend la gélose avide de liquide et celui-ci, placé sur la membrane de collodion, tend à la traverser. On dépose alors 5 gouttes de la culture bactérienne (concentration de 1 à 5·10⁸ cellules/cm³) que l'on étale soigneusement à l'aide d'une baguette de verre. On ferme aussitôt la boîte et la mince couche de suspension filtre à travers la membrane dans un temps variant de 10 à 20 minutes. Toute trace de corps gras dans la membrane empêche cette filtration. Si le milieu ne contient pas un mouillant naturel, par exemple de la peptone, il faut en ajouter;

¹ E. KELLENBERGER, C. r. congrès de m. é. Paris, «Microscopie» (sous presse) (1950).

² J. HILLIER, G. KNAYSIS et R. F. BAKER, J. Bact. 56, 569 (1948).

³ A. G. SMITH, J. Bact. 59, 575 (1950).

⁴ J. HILLIER, S. MUDD, A. G. SMITH, J. Bact. 57, 319 (1949). – S. MUDD et A. G. SMITH, J. Bact. 59, 561 (1950). – S. MUDD, A. G. SMITH, J. HILLIER et E. H. BEUTNER, J. Bact. 60, 635 (1950).

⁵ E. et G. KELLENBERGER, Schweiz. Z. Path. und Bakt. (sous presse).

⁶ E. KELLENBERGER, Proc. Int. Conf. on El. M. Delft, 101 (1949).

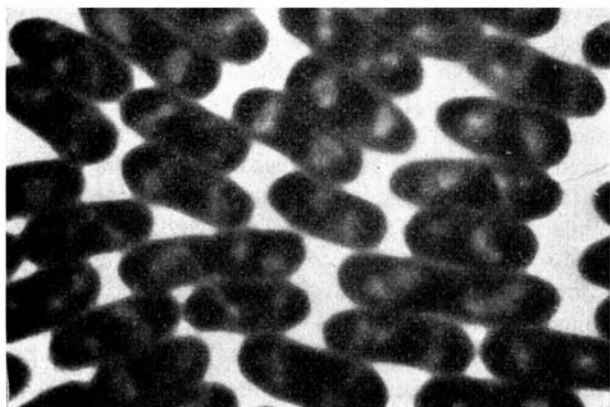


Fig. 1. - Forme primaire végétative des nucléoïdes. Culture de 2 h 30 dans du bouillon Difco ($3 \cdot 10^8$ cellules/cm³).

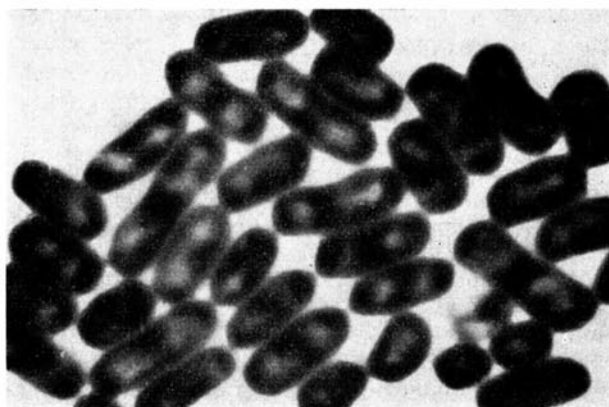


Fig. 2. - Forme de repos des nucléoïdes. Culture de 2 h 30 dans du bouillon Difco, repris dans un tampon isotonique; préparation après 1 h de séjour dans ce tampon à 37°.

nous employons dans ce cas le Kodak Photo-Flo (ancienne formule).

Lorsque tout le liquide a passé, on fixe pendant 4 minutes aux vapeurs de tetroxyde d'osmium (solution à 1 %). On détache la membrane selon la méthode H.K.B.: on découpe un bloc de la gélose que l'on immerge obliquement dans de l'eau distillée. La membrane se détache, flotte sur l'eau et on la recueille sur des grilles-support.

Notre méthode a l'avantage d'éviter toute modification des conditions physiologiques (pH, pression osmotique, etc.) parce que le même milieu de culture utilisé pour la suspension sert, gélifié, de support à la membrane de collodion. Cette technique ne présente pratiquement pas de sélectivité¹. Comme les bactéries ne sont jamais altérées, on peut fixer dès que la filtration est achevée. De cette façon, durant toute la filtration, le milieu ambiant étant celui de la culture, la nutrition cellulaire ne dépend pas d'échanges à travers la membrane. En effet, nos travaux nous ont permis de constater qu'une telle nutrition est inégale et difficile à contrôler.

Comme les auteurs déjà cités, nous obtenons des structures nucléaires qui se présentent sous forme de zones plus minces: elles diffusent donc moins les électrons. On doit admettre que la fixation n'atteint pas aussi bien ces zones qui, sous l'influence de l'eau distillée, perdent une partie de leur contenu. Au cours de l'étude de ce méca-

nisme, nous avons pu montrer avec L. HUBER, que sans contact avec de l'eau distillée, ces zones sont beaucoup plus denses et pratiquement non différenciées. Une fixation d'une minute au lieu de quatre ne fixe que les corps métabolisants. Une cellule non fixée ne présente aucune structure, elle est relativement transparente¹.

Dans nos travaux, nous avons retrouvé, par microscopie électronique, plusieurs formes de nucléoïdes déjà citées dans la littérature². Dans la phase de croissance exponentielle, nous les trouvons sous leur *forme végétative primaire* (fig. 1). Les nucléoïdes sont composés de «chromosomes» en division, selon le schéma indiqué par ROBINOW³. Cette même forme a été déjà observée au microscope électronique par MUDD, HILLIER, SMITH et BEUTNER⁴. En employant notre nouvelle méthode, nous avons pu observer d'autres formes encore.

La *forme végétative secondaire* (PIEKARSKI) apparaît lors de l'action de certains antibiotiques (auréomycine et chlo-

¹ E. KELLENBERGER, l.c.

² G. PIEKARSKI, Arch. Mikrobiol. 8, 428 (1937); Naturwissenschaften 37, 201 (1950). - C. F. ROBINOW, Proc. Royal Soc. London [B], 130, 299 (1942). Addendum de DUBOS *The bacterial Cell* (Harvard Univ. Press). - K. A. BISSET, *Cytology and Life History of Bacteria* (Edit. Livingstone 1950). - B. DELAPORTE, Acta genetica 2, 1 (1950).

³ C. F. ROBINOW, Proc. Royal Soc. London [B], 130, 299 (1942). Addendum de DUBOS *The bacterial Cell* (Harvard Univ. Press).

⁴ S. MUDD et A. G. SMITH, J. Bact. 59, 561 (1950). - S. MUDD, A. G. SMITH, J. HILLIER et E. H. BEUTNER, J. Bact. 60, 635 (1950).

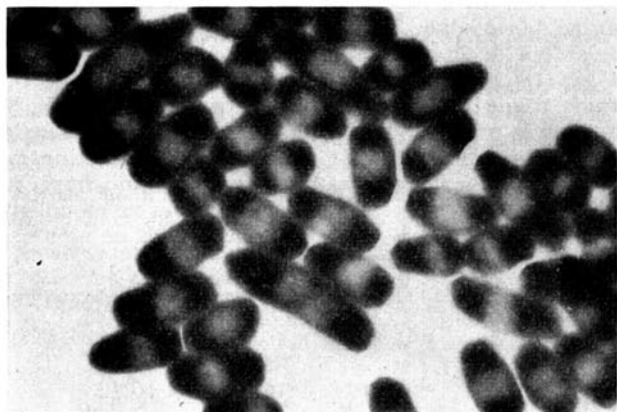


Fig. 3.

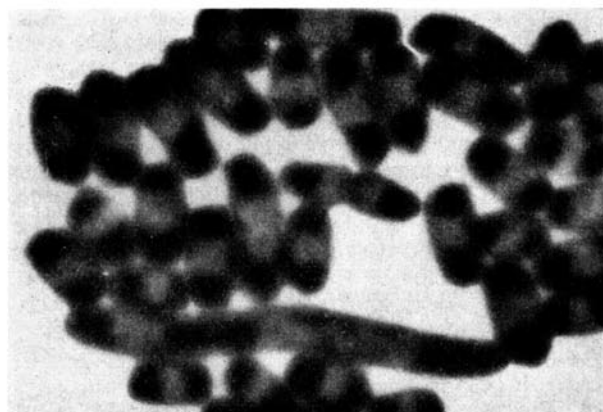


Fig. 4.

Fig. 3 et 4. - Forme secondaire végétative des nucléoïdes. Culture de 2 h 30 dans du bouillon Difco. Ensuite contact de 1 h 30 avec 50 γ de chloromycétine/cm³, ajouté à la culture. Noter la présence de quelques divisions.

romycétine à dose faible, presque bactériostatiques¹). En général nous trouvons alors un seul nucléoïde au centre de la cellule (fig. 3 et 4). Si l'action se fait essentiellement sur une cellule placée sur une surface d'agar, donc aplatie, ces nucléoïdes ont souvent une forme annulaire. Sur les deux figures 3 et 4, la présence de divisions est visible; le nucléoïde se sépare en deux, la cloison se forme entre les deux moitiés et les cellules se divisent. Le comptage confirme cet accroissement du nombre de cellules. L'emploi de la coloration hydrolyse-Giemsa révèle des figures analogues.

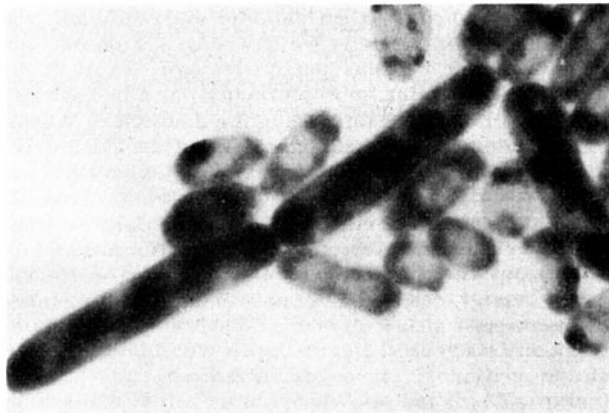


Fig. 5. – Après le même traitement subi par les cellules des figures 3 et 4, on a remis le film de collodion sur de l'agar frais: réapparition de la forme primaire.

Pour étudier le retour de la forme secondaire à la forme primaire, on détache la membrane avec ses cellules en remplaçant l'eau par un milieu nutritif, puis on la recueille sur de l'agar nutritif frais. Après un certain temps, les formes primaires réapparaissent. Comme la nutrition à travers la membrane est insuffisante, le pourcentage des cellules transformées est inférieur au nombre des survivants.

Dès que le métabolisme s'arrête, lors d'une suspension en solution tampon par exemple, nous observons des formes de repos (fig. 2). Nous trouvons soit un nucléoïde en forme de bâtonnet axial, soit deux nucléoïdes ronds; des figures intermédiaires, en forme d'haltères, sont fréquentes.

Quand les cultures dépassent la phase de croissance exponentielle, les nucléoïdes perdent de leur netteté; en même temps, les cellules deviennent plus petites et finalement elles n'ont plus qu'un seul nucléoïde, mal défini, placé entre deux corps métabolisants². Nous ne pouvons pas encore dire si cet état correspond ou non à la forme secondaire végétative. Ce même phénomène semble se produire sous l'action de la streptomycine³. Il est alors fortement accéléré.

E. KELLENBERGER

Laboratoire de microscopie électronique, Institut de physique, Université de Genève, le 2 janvier 1952.

¹ Nous remercions M. le professeur F. CHODAT, Mlle E. SCHORER, D. PARIS et M. B. STEINBERG de nous avoir indiqué ces doses.

² E. KELLENBERGER, C. r. congrès de m. é. Paris, «Microscopie» (sous presse) (1950).

³ Nous remercions M. le professeur E. GRASSET et MM. les Drs E. NOVEL et V. BONIFAS de nous avoir indiqué les concentrations adéquates.

Summary

With the electron microscope, only the primary vegetative form of the nucleoid had been observed till now on bacterial cells in the latent phase of growing. We propose an improved method which enables us to observe the nucleoids in any physiological state. Secondary vegetative forms are shown in the division process and 3 resting forms. The samples are prepared from liquid cultures by means of a filtration through the supporting membrane. Changes in the physiological conditions are avoided.

Feinbau der Membran gequollener Stärkekörner

Durch Schwellung in heissem Wasser verquellen die Stärkekörner bei der Verkleisterungstemperatur zu grossen Blasen mit flüssigem Inhalt. Ihre Wandung ist eine elastische, semipermeable Membran, denn die Blasen schrumpfen, wenn sie in hypertonische Lösungen gebracht, und schwellen wieder, wenn sie in hypotonische Lösungen zurückversetzt werden.

Oberhalb der Verkleisterungstemperatur können die Blasen zum Platzen gebracht werden. Der flüssige Inhalt fliesst dann aus, und es bleiben unlösliche Bälge zurück. Diese sedimentieren in stark verdünnten Lösungen und können durch Zentrifugierung oder sogar durch blosses Dekantieren von der Stärkelösung getrennt und reingewaschen werden. Während die ausgeflossene Stärkelösung entsprechend ihrem Amylosegehalt die tiefblaue Jodreaktion liefert, färben sich die Stärkebälge violett an, was auf ihren Aufbau aus Amylopektin hinweist (MEYER¹).

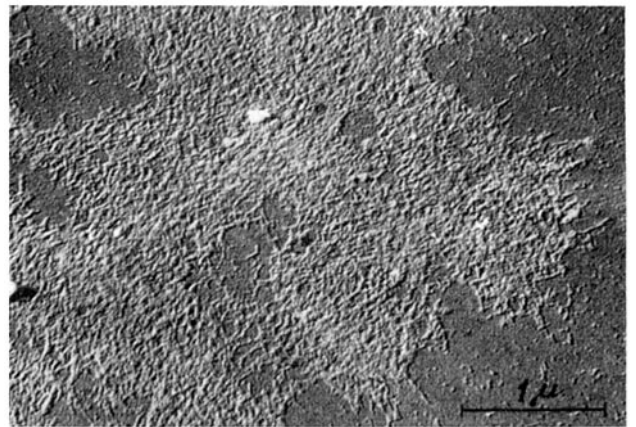


Abb. 1. Elektronenmikrogramm der Haut eines verquollenen Kornes von Kartoffelstärke (Aufnahme K. MÜHLETHALER).

Die Reingewinnung solcher Amylopektinmembranen gelingt bei Kartoffelstärke besonders leicht. Es genügt, die Körner in einem grossen Überschuss von Wasser aufzukochen und die mikroskopischen Bälge der geplatzten Blasen sich setzen zu lassen. Durch Anfärbung mit Jod können die Häute trotz ihrer Feinheit bei der Waschoperation leicht beobachtet und auch im Mikroskop ohne Schwierigkeiten aufgefunden werden.

Die Semipermeabilität dieser Membranen muss durch eine amikroskopische retikuläre Struktur des Amylopektingels bedingt sein. Ob sie ausserdem eine gröbere

¹ K. H. MEYER, *Hochpolymere Chemie*, Bd. 2 (Akad. Verlagsgesellschaft, Leipzig 1940).