

Effect of some Detergents on the Surface Membrane of Penicillin Spheroplasts

Experiments to elucidate the ultrastructure of spheroplast membrane have been intensified by studies of the influence of some detergents on the surface membrane of penicillin spheroplasts in *Proteus vulgaris*.

Strain P₂ was used. Spheroplasts were produced by adding 2000 U of penicillin/ml to the 18 h broth culture¹. After 4 h incubation the spheres were submitted to osmotic lysis. After having been treated by trypsin (1 mg/ml) for 3 h they were purified by repeated washing in an ultracentrifuge. There was a certain percentage of rod cell walls in preparations that were not removed, serving us as a means of comparison with the spheroplast membranes. The material was transferred onto grids. Dried grids were put on the surface of 1% sodium lauryl sulphate (LS) or 5 or 10% sodium desoxycholate (DS) for 30 min. After several washings with filtered distilled water the grids were either shadowed with gold-palladium or 'stained' with uranium acetate for 30 min and were examined under the electron microscope Tesla BS 242. As a model of a simple lipoprotein membrane the ghosts of lysozyme protoplasts of *B. megaterium* M. were used, which were handled in the same way.

After the action of LS a disintegration of most membranes into irregular globular bodies 100–200 Å tall and 500–900 Å in diameter was observed. These formations were clearly seen in samples stained with uranium acetate (Figures 1 and 2). In the case of the cell walls of normal rods the disintegration into globular bodies was not

usually of such a marked character. Considerable variability was observed as to the degree of disintegration of individual membranes by LS.

A similar picture was obtained following the action of DS. The globular formations were slightly larger (800–1500 Å) and looser; this may depend on the incubation time with DS or its concentration, e.g. a 10% DS caused a strong disintegration of membranes into isolated globules.

Protoplast membranes were dissolved by the two substances. As long as they were fixed by formaldehyde, uranium acetate or potassium permanganate they were completely resistant to their action (see also ²). Our results concerning the cell walls correspond more or less to those described by WEIDEL, FRANK, and MARTIN³, MARTIN and FRANK⁴, and others. The disintegration into similar globular formations was observed after the action of NaOH on isolated cell walls by SALTON and HORNE⁵ and YOSHIDA et al.⁶. It is generally assumed that the

¹ M. V. NERMUT, *L-Cycle of Bacteria, its Biological and Medical Significance* (State Health Publ. House, Prague 1960).

² A. R. GILBY and A. V. FEW, *J. gen. Microbiol.* 23, 19 (1960).

³ W. WEIDEL, H. FRANK, and H. H. MARTIN, *J. gen. Microbiol.* 22, 158 (1960).

⁴ H. H. MARTIN and H. FRANK, *Z. Naturforschg.* 17b, 190 (1962).

⁵ M. R. J. SALTON and R. W. HORNE, *Biochim. biophys. Acta* 7, 177 (1951).

⁶ N. YOSHIDA, I. FUKUYA, I. KAKUTANI, S. TANAKA, K. TAKAISHI, K. NISHINO, and T. HASHIMOTO, *J. exp. Med.* 1, 105 (1954).

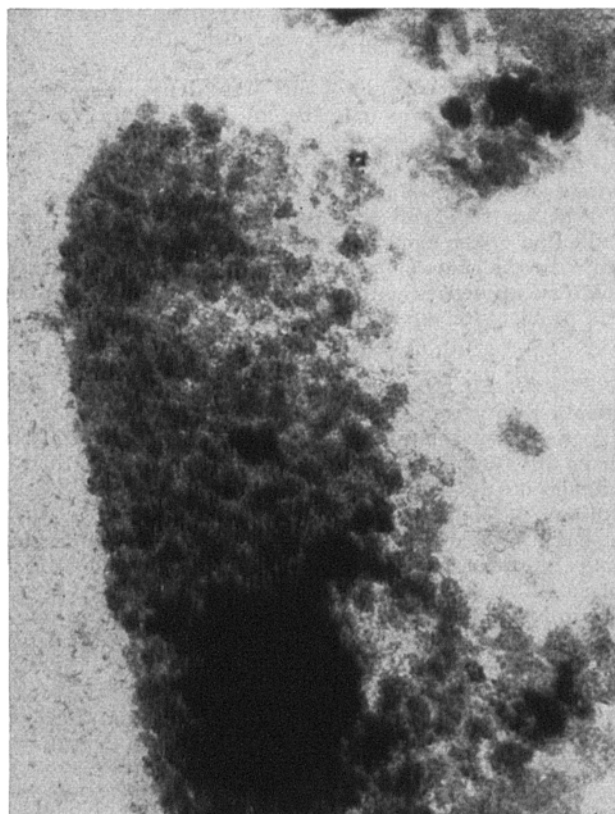


Fig. 1. Cell wall of *Proteus vulgaris* exposed to 1% laurylsulphate for 30 min. Stained with uranium acetate. $\times 32,600$.

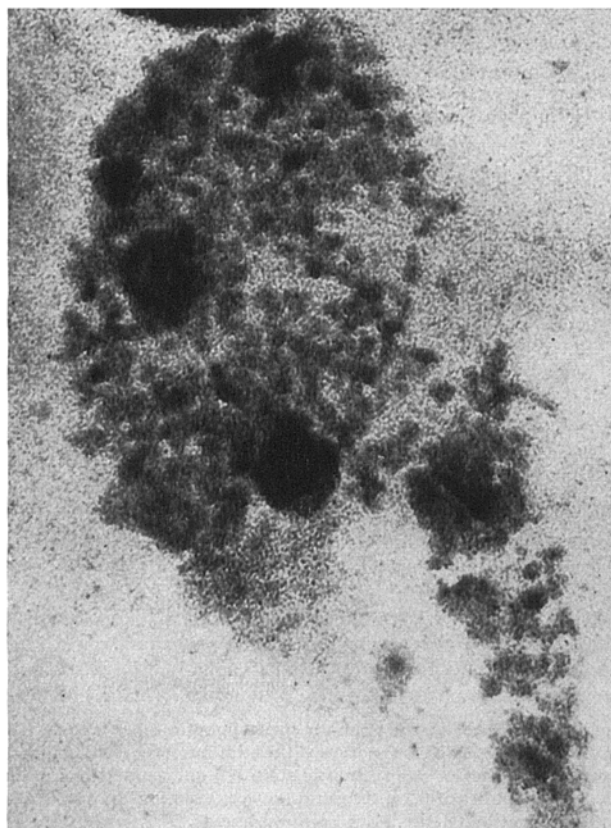


Fig. 2. Spheroplast membrane of *Proteus vulgaris* treated in the same way. Stained with uranium acetate. $\times 24,000$.

detergents act on the lipids both in the cell walls and in the cytoplasmic membranes⁷⁻⁹. Electron micrographs of cell walls treated by these compounds also present a picture of 'corroded' membranes deprived of the cement substance. The extraction of lipoproteins proceeds gradually. Higher concentration and/or temperature cause deeper disintegration of the membranes and a more effective denudation of lower layers.

From our results conclusions can be drawn concerning especially the composition of the spheroplast membrane. It appears that it is very similar to that in normal cell wall. Thus it is substantially more complicated than was generally assumed. It corresponds to our previous views based on the cytochemical study of spheroplasts and protoplasts of bacteria¹⁰. The attempt to isolate the basal membrane (R layer) was not successful with spheroplasts.

It is interesting to note that boiling the cells in 1% LS after pretreatment with potassium tellurite or fixation by formaldehyde did not cause the total destruction of cells as was reported by SHAFI and SALTON¹¹. In this case very fine, web-like, rod-shaped membranes were found besides round or oval smooth membranes of lipopolysaccharide nature^{9,12}.

The surface of penicillin spheroplasts is thus a considerably complex structure, which differs from the normal cell wall by the loss of a part of mucopolysaccharides and

elasticity thus acquired. Similar results have been described after the action of a cationic detergent, 'Septonex'¹³.

Zusammenfassung. Unter Einwirkung von Natriumlaurylsulfat oder Desoxycholat zerfallen die Oberflächenmembranen von Penicillinsphäroplasten in globuläre Gebilde verschiedener Grösse (500 bis zu 900 Å d). Isolierte Zellwände von *Proteus* verhalten sich ähnlich. Protoplastenmembranen von *B. megaterium* werden durch beide Stoffe rasch lysiert.

M. V. NERMUT

Institute of Microbiology, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague (Czechoslovakia), December 30, 1963.

⁷ A. BOLLE and E. KELLENBERGER, Schw. Z. Path. Bakt. 21, 714 (1958).

⁸ R. G. E. MURRAY, Canad. J. Microbiol. 9, 381 (1963).

⁹ S. RAZIN and M. ARGAMAN, J. gen. Microbiol. 30, 155 (1963).

¹⁰ M. V. NERMUT, Folia biol. (Praha) 8, 239 (1960).

¹¹ F. SHAFI and M. R. J. SALTON, J. gen. Microbiol. 22, 137 (1960).

¹² W. WEIDEL, H. FRANK, and W. LEUTGE, J. gen. Microbiol. 30, 127 (1963).

¹³ M. V. NERMUT, Z. allgem. Mikrobiol. 4, 92 (1964).

Zur Genese hepatozellulärer Kerneinschlüsse bei Colchicinvergiftung

Bei Colchicinvergiftung treten in Leberepithelien Kerneinschlüsse auf¹⁻⁴, bei denen es sich um Plasmaklusionen handelt, die von einer echten Kernmembran umzogen sind⁴. Sie werden auf eine Eindellung des Ruhekernes zurückgeführt, kommen jedoch auf andere Weise zustande.

Colchicin (4 · 30 j/d i.p.) löst bei weissen Mäusen in der Leber Mitosen aus⁵, vornehmlich in der von dem anflutenden Pharmakon zuerst getroffenen Lappchenperipherie. Ihr Ablauf wird in der bekannten Weise⁶ vielfältig abgewandelt. So findet man unter anderem unipolare, lockere «Sterne», die sich aus Prophasen entwickeln, wenn die weniger empfindlichen Chromosomenfasern noch ausgebildet werden können⁷⁻⁹ und eine Zentrierung der Kernschleifen ermöglichen. In ihrer Mitte ist dann bisweilen das wenig oder gar nicht ausgestaltete Zytozentrum nachweisbar: Es besteht aus Zentriolen, die kaum auseinander gewichen sind¹⁰ und höchstens von wenig Zentrioplasma umgeben werden. Häufiger sind «Versprengungen», bei denen die überkontrahierten Chromosomen keine Fasern mehr ausbilden und daher ohne Ordnung im Zelleib verstreut werden. Das Zytozentrum bleibt gänzlich inaktiviert; von Spindelsubstanz ist nichts zu sehen, allenfalls ist ein kleiner PAS-negativer Eiweiss tropfen («hyaline globule»¹¹) mitten unter den durcheinander liegenden Chromosomen und Mitochondrien anzutreffen. Colchicin unterbindet also nicht nur die Organisation eines an sich vorhandenen Spindelmateriales, es vermag sogar, wohl durch unmittelbaren Angriff an den Zentriolen¹⁰, die Bereitstellung von (Zentral-) Spindelsubstanz vollständig zu unterdrücken.

Besonders bei ungeordneter «Versprengung», aber auch in lockeren «Sternen» verquellen die weiter voneinander entfernten Chromosomen später zunächst zu eigenen kleinen Bläschen (Karyomeren bzw. Karyomeriten). Wenn auch das eine oder andere den Anschluss verlieren oder zugrundegehen kann – die meisten von ihnen treten, während ihrer Umwandlung oder erst darnach, zu grösseren Teilkernen zusammen. Oft entstehen auch einheitliche, polyploide, gegebenenfalls auch aneuploide Grosskerne, die ihrem Werdegang entsprechend^{5,11-13} recht polymorph sein können. Sie werden oft von kürzeren oder längeren «Kernkanälen» durchzogen, deren Wände die Grenzen nicht völlig vereiniger Karyomeriten markieren⁶. In gleicher Weise entstehen derartige «Einfaltungen der Kernmembran» auch bei Tumor- oder Hodgkinzellen. Bei dem Verschmelzungsprozess werden mitunter kleinere oder grössere Plasmaportionen eingeschlossen und dann, von Teilen der primären Karyomeritenmembranen weiterhin begrenzt, in den sekundären

¹ H. HAMPERL, Klin. u. Prax. 1, 186 (1946).

² K. LAMBERS, Virchows Arch. 321, 88 (1951/52).

³ H. H. BUCHMANN, Zbl. Path. 92, 328 (1954).

⁴ W. WESSEL, Virchows Arch. 331, 314 (1958).

⁵ B. MISZURSKI und L. DOLJANSKI, Am. J. Anat. 85, 523 (1949).

⁶ O. J. EIGSTI und P. DUSTIN JR., Colchicine – in Agriculture, Medicine, Biology and Chemistry (Iowa State Coll. Press, 1955).

⁷ J. J. PETERS, J. exp. Zool. 103, 33 (1946).

⁸ S. A. INOUE, Exp. Cell Res. Suppl. 2, 305 (1952).

⁹ W. SIEBS, Z. Zellforsch. 51, 535 (1960).

¹⁰ E. DE HARVEN und W. BERNHARD, Z. Zellforsch. 45, 378 (1956).

¹¹ M. E. GAULDEN und J. G. CARLSON, Exp. Cell Res. 2, 416 (1951).

¹² A. M. BRUES und E. B. JACKSON, Am. J. Cancer 30, 504 (1937).

¹³ P. SENTEIN, Path. et Biol. 9, 445 (1961).