

A 'Warburg' Respirometer for Measurements Under Continuous Irradiation

For investigations of recovery phenomena in micro-organisms, respiration rates under continuous X-irradiation had to be measured in situ and without handling the samples. A special Warburg respirometer was designed, incorporating an X-ray tube mounted below its water-bath.

A commercially available instrument (Fotowarburg F 26, C. Braun, Melsungen, Germany) was modified. The optical system was removed and the glass bottom of the water-bath replaced by an aluminium sheet, 5 mm thick. This was milled out to a thickness of 0.3 mm at 4 positions. The thin areas were 3 cm by 5 cm with 8 cm between them.

A 100 kVp X-ray tube (type FA 100/2, C. H. F. Müller, Hamburg, Germany) was mounted on a chain-driven sledge below the water-bath and moved by remote control. Accurate positioning was effected reproducibly

by electric relays which cut the current to the motor driving the chain.

Both the Warburg assembly and the X-ray tube were enclosed in 5 mm lead sheet. Flap doors in the shielding allowed adjustment of the Warburg controls. The power supply was brought in through holes in the bottom. The connecting tubes from the manometers to the recorder were guided through a 5 mm slit made by overlapping lead sheets.

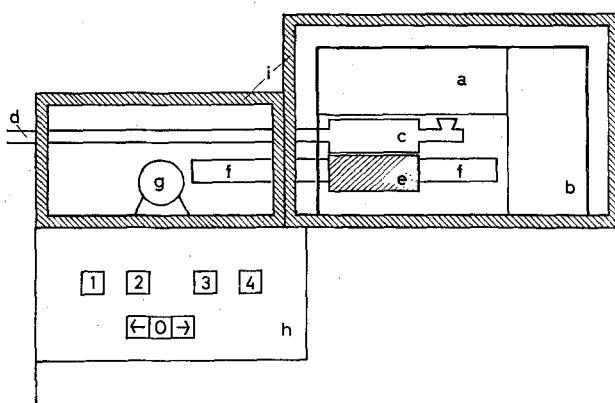
The manometric recorder used (Longator, C. Braun, Melsungen) provided for 7 simultaneous traces. One was used for the thermobarometer and 6 for the experimental vessels.

The X-ray beam from the tube run at 100 kVp, 20 mAmp, was collimated by a 5 mm lead applicator. Isodose curves were measured in air using a thimble-chamber and a Siemens dosimeter. One vessel was exposed at a time. The dose-rate from scattered radiation to the other vessels was less than 1% of the experimental dose-rate if they were mounted close to the bottom of the water-bath. The dose-rate in the cell suspension was determined to be 4.8 Krads/min by ferrous sulphate dosimetry ($G \text{ Fe}^{+++} = 15.5$)¹.

Zusammenfassung. Der Aufbau einer Apparatur zur manometrischen Respirationsmessung kontinuierlicher Röntgenstrahlung wird beschrieben.

W. TRAMPI SCH, J. KIEFER,
H. WALDVOGEL and E. L. SATTLER

Strahlenzentrum, Institut für Biophysik,
D-6300 Giessen (Germany), 27 May 1969.



Basic design of the apparatus: the front flap-doors and the manometers are removed. Explanation: (a) waterbath of F26; (b) control panel of F26; (c) X-ray tube; (d) cooling water and high voltage; (e) sledge; (f) rail for the sledge; (g) motor; (h) front panel of relay box, (i) shielding.

¹ The discussions with Professor A. SCHRAUB and the substantial technical support of Mr. W. SCHNEIDER are gratefully acknowledged.

Reinigung mikrobiologischer Objekte zur Vorbereitung elektronenmikroskopischer Präparate durch Ultrafiltration

Bei der Vorbereitung der Präparate für das Elektronenmikroskop ist es nötig, dass die zu beobachtenden Objekte von Lösungen (Nährböden, lösliche Zellbestandteile usw.), in denen sie sich vor der Isolierung befanden, gereinigt werden. Die studierten Objekte werden daher gewöhnlich in destilliertes Wasser oder in eine Lösung flüchtiger Salze überführt. Wenn es sich um nicht feste, um brüchige, faserige oder netzförmige Strukturen und um kleine Materialmengen handelt und wenn es notwendig ist, bei der Reinigung auch grössere Moleküle (Polypeptide, Eiweißstoffe oder Fragmente von Nuklein-säuren usw.) zu entfernen, stösst der Reinigungsprozess auf eine Reihe von Hindernissen.

Als Beispiel kann die Vorbereitung der Präparate von Mykoplasmen und L-Formen der Mikroorganismen oder

Bakteriophagen aus Kulturen mit einer verhältnismässig niedrigen Anzahl von Partikeln pro Volumeinheit dienen. Autoren von Arbeiten über die Vorbereitung von Bakteriophagen für die Elektronenmikroskopie¹⁻⁴ führen an, dass es möglich ist, die Reinigung von Phagolysaten

¹ S. BRENNER, G. STREISINGER, R. W. HORNE, S. P. CHAMPE, I. BARNETT, S. BENZER und M. W. REES, *J. molec. Biol.* 1, 281 (1959).

² D. E. BRADLEY, *The Morphology and Physiology of Bacteriophages as Revealed by Electron Microscope*, *J. R. microsc. Soc.* 84, 257 (1965).

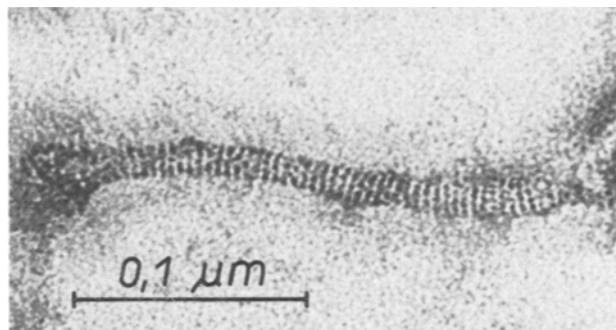
³ D. E. BRADLEY, *Bact. Rev.* 31, 230 (1967).

⁴ A. S. TICHONENKO, in *Elektronenmikroskopische metody issledovaniya biologicheskikh objektov*, (Verlag Nauka, Moskau 1963), p. 30.

durch Zentrifugieren, Dialyse oder Agarfiltration durchzuführen. Das Ultrazentrifugieren gibt gute Resultate vor allem bei einer grösseren Menge einer genügend konzentrierten Suspension von Bakteriophagen, besonders wenn es sich nicht um Phagen mit sehr langen, dünnen und brüchigen Schwänzen und solche mit Fasern an den Schwänzen handelt. Mit einer Dialyse kann man eine Reihe von Stoffen mit grösseren Molekülen nicht beseitigen. Die Agarfiltration ist in ihrer Anwendung ebenfalls begrenzt, vor allem durch die kleine Flüssigkeitsmenge, die pro Filterflächeneinheit verarbeitet werden kann, und die Unmöglichkeit, eine beliebige Membran zu wählen, die dann als Objektträger für die elektronenmikroskopische Beobachtung dient.

Als Methode, die die erwähnten Verfahren günstig ergänzen kann, benützten wir die Ultrafiltration durch Kollodium-Membranfilter⁵ mit einem durchschnittlichen Poredurchmesser von 300 Å und einer kreisförmigen Filtrationsfläche von 2,5 cm² (Durchmesser 18 mm), bei einem Überdruck von 1,25 atm von Stickstoff oder Luft. Auf den Membranfilter gossen wir 1 ml einer 2%igen Ammoniumazetatlösung in Wasser, deren pH auf den Naturalwert durch Ammoniumkarbonat eingestellt worden war, und liessen 0,6 ml Flüssigkeit durch einen Filter durchfliessen. Dann fügten wir 3 ml der Phagensuspension hinzu, die 8×10^7 bis 10^{10} Phagen/ml enthielt und von grösseren Teilchen durch Zentrifugieren bei 12000 g gereinigt worden war. Wir filtrierten diese Menge, bis über dem Filter ungefähr 0,4 ml übrigblieb. Dann fügten wir 1 ml einer neutralen Lösung der oben erwähnten flüchtigen Salze hinzu und filtrierten abermals, bis über dem Filter ungefähr 0,4 ml übrigblieb. Dies führten wir im ganzen 4mal durch. Die Konzentration der gelösten Stoffe, die den Filter passierten, hat sich also durch dieses Verfahren ungefähr 250mal verringert. Dann fügten wir zu der Phagensuspension, die über dem Filter aufgefangen war, 2 ml der neutralen Lösung von flüchtigen Salzen hinzu, wuschen damit den Filter, gossen sie in ein besonderes Gefäss ab, nahmen die ganze Filtrationseinrichtung auseinander und reinigten sie durch Auswaschen mit destilliertem Wasser. Dann filtrierten wir die Phagensuspension aus der ersten Filtrierung durch einen gleichen Vorgang entweder durch dieselbe oder eine neue Filtrationsmembran mit der gleichen Porosität. Die resultierende Verdünnung der gelösten Stoffe betrug also ungefähr das 65000fache. Alle Änderungen des Filtrationsdruckes und der Ionenstärke musste man so zart als möglich durchführen.

So gewaschene Bakteriophagen benützten wir zur Herstellung der Präparate, die dann positiv mit Uranylazetat oder negativ mit einer neutralen Lösung von Natriumphosphowolphamat gefärbt oder metallbedampft wurden. Die Qualität des Durchwaschens, die Unversehrtheit der Teilchen und die Färbung ermöglichen



Die Struktur des Phagenschwanzes des Bakteriophagen 81 *Straphylococcus aureus*. Präparat mit Uranylazetat gefärbt. Elektronenoptische Vergrößerung $\times 35\,800$. Präparat: S. KLHŮFKOVÁ, B. LIŠKA. Aufnahme: VL. DRAHOŠ, Institut der Instrumententechnik der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften.

ten, Details von ungefähr 20 Å in der Struktur der Schwänze und in den Hüllen der Phagenköpfe zu beobachten (Figur). Zum Zwecke einer noch vollkommenen Reinigung und Eindickung ist es möglich, eine so zubereitete Bakteriophagensuspension in einem Cäsiumchloridgradienten zu zentrifugieren und sie bei der Filtrierung in eine CsCl-Lösung zu überführen.

Bei der Reinigung von Mykoplasmen und L-Formen ist es im Hinblick auf die grösseren Ausmasse dieser Objekte nicht nötig, Filter mit so kleinen Poren zu benützen, und man kann dann einen niedrigeren Filtrationsdruck anwenden. Deshalb eignet sich dafür die übliche Unterdruckfiltration durch Membranfilter mit einer durchschnittlichen Porosität von ungefähr 0,1 μm.

Summary. A method for preparation of electron microscopic specimens by ultrafiltration can be used for bacteriophages, mycoplasma, and fragile biological particles, especially from solutions containing low concentrations of these particles and when it is necessary to remove also macromolecules up to a certain size.

B. LIŠKA und J. ŠMARDA

Biophysikalisches Institut der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften in Brno und Biologisches Institut der medizinischen Fakultät der J.-E.-Purkyně-Universität, Brno (Tschechoslowakei), 16. Juni 1969

⁵ M. ROSENBERG und J. ŠMARDA, Česká biol. 4, 449 (1955).

CONGRESSUS

Switzerland The 5th EUCHEM Conference on Stereochemistry

at the Bürgenstock, near Lucerne, 3–9 May 1970.
The number of participants will be limited. Inquiries and applications should be addressed before 10 January 1970

to the Chairman, Professer E. Havinga, Chemische Laboratoria, Rijksuniversiteit, Postbox 75, Leiden (The Netherlands).