

mit Temperaturzunahme von 27 auf 37°, was im Gegensatz zu den hier vorgelegten Untersuchungen an der Säugerleber steht, aber vielleicht damit erklärt werden kann, daß verschiedene Gewebe eines und desselben Tieres auf den kombinierten Einfluß von DNOC und Temperatur verschieden reagieren. Die eigenen Befunde über die Atmung der Amphibienhaut sprechen dafür²³. Entsprechend seinem abweichenden Verhalten war die Aktivierungsenergie des Meerschweinchendarms (berechnet aus dem angegebenen Q_{10}) nur etwa 9300 Kalorien. Außerdem war in der genannten Untersuchung die Temperatur von 34° dadurch ausgezeichnet, daß bei ihr zum Unterschied von der Atmung, das absolute

²³ Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere 1958, im Druck.

Maximum der anaeroben und aeroben Glykolyse und zugleich ein relatives Maximum (des Verhältnisses Glykolyse/Atmung) auftrat. Obwohl die Autoren zu einer mit uns übereinstimmenden Schlußfolgerung gelangen, nämlich daß die Temperaturregulation schon zellulär vorgebildet sein muß, läßt sich vorläufig nicht sagen, wie weit diese Befunde mit unseren Ergebnissen im Zusammenhang stehen.

Herrn Dr. K. H. SPITZY danke ich für die Bereitstellung von Mitteln aus dem Fonds des Antibiotica-Forschungslaboratoriums an der hiesigen Klinik zur Durchführung der vorliegenden Untersuchung. Herrn Prof. F. H. JOHNSON (Princeton, USA.) schulde ich für seine wertvollen Kommentare herzlichen Dank.

Vergleichende taxonomische, morphologische und serologische Untersuchungen an insektenpathogenen Rickettsien

Von ALOYSIUS KRIEG

Aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft,
Institut für biologische Schädlingsbekämpfung, Darmstadt
(Z. Naturforschg. 13 b, 555—557 [1958]; eingegangen am 5. März 1958)

The definition of genus *Rickettsiella* given by PHILIP should be completed and corrected because in all instars of insects particularly the cytoplasm, not the nucleus of the diseased cells was infected. No morphological differences were found between the known types *Rickettsiella popilliae*, *Rickettsiella melolonthae* and *Rickettsiella tipulae*. In serological experiments a group-specific partial-antigen and a type-specific partial-antigen were demonstrated in each of the studied *Rickettsiellae*.

Bei den hier zur Diskussion stehenden insektenpathogenen Rickettsien handelt es sich nach PHILIP¹ (1956) um Vertreter des Genus *Rickettsiella* des Tribus *Wolbachieae*. Bisher sind solche Rickettsien bei drei Insekten-Arten beschrieben worden und zwar von DUTKY und GOODEN² (1952) in Larven von *Popillia japonica* Newm. (Coleoptera), von WILLE und MARTIGNONI³ (1952) in Larven von *Melolontha melolontha* L. (Coleoptera) und von MÜLLER-KÖGLER⁴ (1958) in Larven von *Tipula paludosa* Meig. (Diptera). Von DUTKY und GOODEN wurde für die aus *P. japonica* isolierte Rickettsie auf Grund ihrer Filtrierbarkeit in Analogie zu den filtrablen wirbeltierpathogenen Rickettsien als Benennung *Coxiella popilliae* vorgeschlagen. KRIEG⁵ (1955 a) nannte die aus den Engerlingen von *Melolontha spec.* isolierte Rickettsie *Rickettsia melolonthae*. Für die von MÜLLER-KÖGLER dargestellte *Tipula*-Rickettsie hat er den Namen *Rickettsiella tipulae* vorgeschlagen. Nach der von PHILIP vorgeschlagenen Nomenklatur wären die

drei Arten als *Rickettsiella popilliae* (DUTKY et GOODEN), *Rickettsiella melolonthae* (KRIEG) und *Rickettsiella tipulae* MÜLLER-KÖGLER zu benennen.

Die drei Rickettsien befallen das Cytoplasma vornehmlich der Fettkörperzellen der Wirtstiere im Larvenstadium. Sowohl beim Maikäfer als auch bei der Wiesenschnake konnten aber Rickettsiellen auch in Puppen und Imagines nachgewiesen werden. Interessant ist in den befallenen Zellen das Auftreten von bipyramidalen Kristallen (1–3 µ groß), die offenbar für *Rickettsiella*-Infektionen typisch sind. Über ihre Natur soll an anderer Stelle berichtet werden, vgl. KRIEG⁶ (1958). Nach Untersuchungen von KRIEG⁷ (1955 b) können die Rickettsien auch unter bestimmten Umständen für Wirbeltiere pathogen sein. Die Definition des Genus *Rickettsiella* durch PHILIP muß daher ergänzt und verbessert werden, wenn er schreibt: „minute intracellular rickettsial-like organisms which are pathogenic for certain insect larvae but not known or likely to be for any

¹ C. B. PHILIP, Canad. J. Microbiol. 2, 261 [1956].

² S. R. DUTKY u. E. L. GOODEN, J. Bacteriol. 63, 743 [1952].

³ H. WILLE u. M. E. MARTIGNONI, Schweiz. Z. allgem. Pathol., Bakteriell. 15, 470 [1952].

⁴ E. MÜLLER-KÖGLER, Naturwissenschaften 45, 248 [1958].

⁵ A. KRIEG, Z. Naturforschg. 10 b, 34 [1955 a].

⁶ A. KRIEG, Z. Naturforschg. 13 b, 374 [1958].

⁷ A. KRIEG, Naturwissenschaften 42, 609 [1955 b].

vertebrates; filtrable, associated with intracellular crystalline inclusions, and reported to infect *cell nuclei*." Es wird deshalb für das Genus *Rickettsiella* Philip als neue Definition vorgeschlagen: „Kleine, filtrable, intrazellulär vorkommende, rickettsien-ähnliche Organismen, welche im allgemeinen das Cytoplasma befallen und in Larven in erster Linie den Fettkörper besiedeln. Sie werden außer in Larven auch in Puppen und Imagines gefunden und sind pathogen für Arthropoden, unter Umständen auch für Vertebraten. In den befallenen Zellen der Arthropoden wird Kristallbildung beobachtet.“

Definitionsgemäß gehört also die kürzlich von HALL und BADLEY⁸ (1957) als *Rickettsiella stethorae* beschriebene Rickettsie nicht zu diesem Genus, da sie keine Kristallbildung induziert. Auch in ihrem Gewebetropismus weicht sie von den oben genannten drei Typen ab: Sie befällt das Mitteldarmepithel, welches von den drei Rickettsiellen nicht befallen wird.

Über Wirtsspezifität und Krankheitsdauer bei Rickettsiellen liegen leider keine sehr umfangreichen Untersuchungen vor. So läßt sich nach DUTKY und GOODEN die *Rickettsiella popilliae* auf *Phyllophaga anxia* LeC., *Phyllophaga ephelida* Say und *Amphimallus majalis* Razoum. übertragen. Die perorale Infektion führt bei *Popillia japonica* in etwa 45 Tagen zum Tod. Die Maikäfer-Rickettsie ist übertragbar auf *Amphimallus solstitialis* L. und *Phyllopertha horticola* L. Werden Larven von *Melolontha melolontha* und *Melolontha hippocastani* F. peroral infiziert, so sterben sie bei Zimmertemperatur nach 90–120 Tagen. Bei peroraler Infektion mit *Rickettsiella tipulae* sterben bei Zimmertemperatur die Larven von *Tipula paludosa* in 40–80 Tagen (MÜLLER-KÖGLER 1958).⁷ Über die Wirtsspezifität ist noch nichts bekannt.

Die vorliegenden Untersuchungen sollten die Frage klären, ob es sich bei den bisher gefundenen insektenpathogenen Rickettsiellen um drei selbständige Arten handelt, oder ob sie identisch sind. Hierzu wurden morphologische und serologische Untersuchungen angestellt.

Morphologische Untersuchungen

Nach Angaben von DUTKY und GOODEN (1952) ist die von ihnen beschriebene Rickettsie aus *Popillia japonica* etwa $200 \cdot 600 \text{ m}\mu$ groß (Abb. 2*). Im Verlauf der nunmehr 3-jährigen eigenen Beobachtungen

an Maikäfer-Rickettsien konnte auch hier *nur ein Typus* von etwa $200 \cdot 600 \text{ m}\mu$ Größe konstant nachgewiesen werden (Abb. 1), der im Initialstadium der Vermehrung Ketten zu bilden vermag („Jugendformen“) (KRIEG 1955 a). Die von MÜLLER-KÖGLER (1958) in *Tipula paludosa* gefundene Rickettsie wurde elektronenmikroskopisch dargestellt (Abb. 3). Nach Messung an der elektronenmikroskopischen Abbildung beträgt ihre Größe $210 \cdot 460 - 610 \text{ m}\mu$. Auch sie vermag im Initialstadium der Vermehrung Ketten zu bilden.

Infolge der geringen Größe sind diese Rickettsien gerade noch filtrabel. Rein morphologisch bestehen keine großen Unterschiede zwischen ihnen.

Serologische Untersuchungen

Serologische Untersuchungen wurden zunächst zu diagnostischen Zwecken mit einem Antiserum gegen *Rickettsiella melolonthae* durchgeführt (KRIEG 1955 b). Bei Agglutination des homologen Antigens wurde ein Titer von 1 : 1000 erhalten. Die Untersuchungen wurden unter Einbeziehung der beiden anderen Rickettsien fortgesetzt. Dabei zeigte sich, daß das Antiserum gegen *Rickettsiella melolonthae* auch *Rickettsiella popilliae* und *Rickettsiella tipulae* mitagglutiniert.

Neue Versuche wurden jetzt mit einem Antiserum gegen *Rickettsiella tipulae* angesetzt. Darstellung der Antigene erfolgte nach der von KRIEG (1955 b) angegebenen Methode. Die Konzentration der Stammsuspension betrug etwa 10^{10} Rickettsien/ml. Das Immunserum gegen *Rickettsiella tipulae* wurde aus Kaninchen gewonnen. Das Immunisierungs-Schema war folgendes: 3 i.v.-Injektionen mit aufsteigenden Mengen (0,5 ml; 1 ml; 2 ml) im Abstand von je 5 Tagen. Nach weiteren 5 Tagen Entblutung und Serumgewinnung. Das Antiserum gegen *Rickettsiella tipulae* agglutinierte das homologe Antigen bis zu 1 : 500, die *Rickettsiella melolonthae* bis zu 1 : 75 und die *Rickettsiella popilliae* ebenfalls bis zu 1 : 75.

Hiernach besteht ein deutlicher Unterschied zwischen *Tipula*-Rickettsien und den Scarabaeiden-Rickettsien. Speziell um die serologische Verwandtschaft bzw. eine mögliche serologische Identität der Scarabaeiden-Rickettsien zu prüfen, wurde eine Agglutinin-Absättigung (nach CASTELLANI) des *Tipula*-Rickettsien-Antiserums mit Maikäfer-Rickettsien

* Abb. 1–3 s. Tafel S. 556 a.

⁸ I. M. HALL u. M. E. BADGLEY, J. Bacteriol. 74, 452 [1957].

Elektronenmikroskopische Aufnahmen.
Die Präparate wurden mit Palladium schrägbedampft.

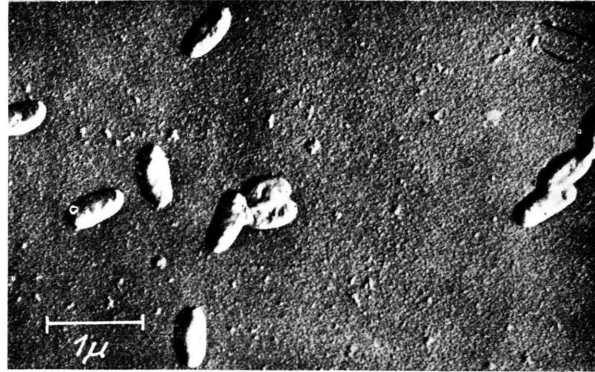


Abb. 1. *Rickettsiella melolonthae*, Abb.-Maßstab 12 000 : 1.



Abb. 2. *Rickettsiella popilliae*, Abb.-Maßstab 12 000 : 1.

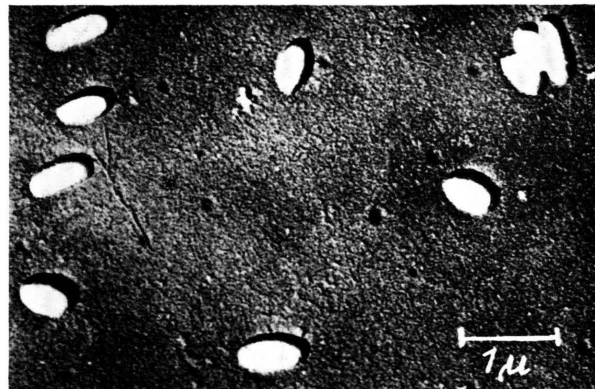


Abb. 3. *Rickettsiella tipulae*, Abb.-Maßstab 12 000 : 1.

sien durchgeführt. Hierzu wurden 300 mg reine Rickettsien aus *Melolontha spec.* in 5 ml des Antiserums gegeben. Das Gemisch wurde unter Schütteln 6 h bei 38°C und 20 h bei 4°C gehalten, dann wurden die Rickettsien vom Serum scharf abzentrifugiert. Das überstehende nunmehr gegen die Maikäfer-Rickettsien abgesättigte Serum wurde gegen die verschiedenen Rickettsien-Stämme austitriert: Während das Serum nicht mehr mit Maikäfer-Rickettsien zu reagieren vermochte, wurden die *Tipula*-Rickettsien bis zu einem Titer von 1 : 250 und die *Popillia*-Rickettsien bis zu 1 : 25 agglutiniert. Aus den serologischen Daten ist zu schließen, daß die drei genannten Rickettsien ein gruppenspezifisches Teilantigen und außerdem je ein artspezifisches Teilantigen besitzen.

Zur Absättigung von Anti-*R. tipulae*-Serum durch Rickettsien aus *Popillia japonica* stand leider nicht genügend Antigen zur Verfügung, desgleichen waren

nicht genügend *Tipula*-Rickettsien zur Absättigung des Anti-*R. melolonthae*-Serums vorhanden. Trotzdem ergibt sich aus diesen serologischen Untersuchungen, daß es sich bei den drei zur Diskussion stehenden Rickettsien offenbar um drei verschiedene Serotypen (Arten) der Gattung *Rickettsiella* handelt, die sich morphologisch jedoch kaum unterscheiden.

Herrn Dr. S. R. DUTKY, US. Dept. of Agric. Insect Pathology, Station Beltsville, Maryland, danke ich für die Überlassung der rickettsien-kranken Engerlinge von *Popillia japonica* und Herrn Dr. MÜLLER-KÖGLER, Biol. Bundesanstalt, Darmstadt, für die Überlassung von rickettsien-kranken Larven von *Tipula paludosa*. Die EM-Aufnahmen wurden durch das freundliche Entgegenkommen von Herrn Prof. Dr. U. HOFMANN, Eduard-Zintl-Institut der TH Darmstadt, und durch die Gastfreundschaft der Fa. Carl Zeiß, Abteilung für Elektronenmikroskopie, ermöglicht.

Durchgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

NOTIZEN

Potentiometric Studies on Mercury molybdate

By C. M. GUPTA and RAM SAHAI SAXENA

Chemical laboratories, Government College,
Kota (Rajasthan)

(Z. Naturforschg. **13 b**, 557—559 [1958]; eingeg. am 19. Mai 1958)

The formation of mercury (ic) molybdate has been studied from E.M.F. measurements involving potentiometric titrations between Na_2MoO_4 solution ($p_{\text{H}}=7.2$ to 7.3) and $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ ($p_{\text{H}}=1.4$ to 2.0) using platinum as indicator electrode, with either of the reactants alternatively used as the titrant. A marked change in E.M.F. is obtained at the equivalence point corresponding to the formation of insoluble normal mercury molybdate having the composition $\text{HgO} \cdot \text{MoO}_3$.

A survey of literature reveals that there are meagre references on the study of mercury molybdate. A few investigators have only prepared mercury molybdate. According to HIRZEL¹, finely divided HgO is rapidly attacked by a concentrated solution of acid ammonium molybdate and after boiling for some time, a yellowish white granular precipitate is formed. The composition of the precipitate was not determined.

Molybdate ion exists in different state of aggregation depending on p_{H} of the solution. This has been esta-

blished by JANDER² and his collaborators and other workers. It is of interest, therefore, to study the conditions, favourable for the precipitation of mercury molybdate by applying electro-metric methods.

'Analar' (B.D.H.) chemicals were used. Na_2MoO_4 solution was estimated as $\text{MoS}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Analytica chimica Acta **9**, 263 [1953]) and $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ was prepared in minimum amount of dil HNO_3 and was estimated as $\text{Hg}(\text{CNS})_2$ by titrating against KCNS which was standardised by A.R. AgNO_3 (VOGEL, 'A Text Book of quantitative analysis', page 265—266).

Potentiometric Procedure

For measurement of E.M.F. Cambridge p_{H} meter was used. A bright platinum wire was used as indicator electrode in conjunction with saturated calomel electrode. Titrations were done in aqueous and aqueous alcoholic solutions. Titrations in presence of alcohol were done up to a total concentration of 20% by volume. The curves were plotted between the volume of titrant and the E.M.F. observed. From the sharp jump in the potential indicated by titration curve, the end point could be found out. Mercury nitrate and sodium molybdate were alternately used as titre and the titrant was added by the help of a microburette. p_{H} of the solutions were measured using glass electrode of the range (1 to 13 p_{H}) with the help of buffer solutions.

¹ C. H. HIRZEL, Liebigs Ann. Chem. **84**, 267 [1852].

² G. JANDER u. Mitarbb., Ber. dtsch. chem. Ges. **194**, 383 [1930].