ACTA BIOLOGICA

ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS
A. ÁBRAHÁM, B. FALUDI, B. GYŐRFFY, L. HARANGHY, I. SZÖRÉNYI,
J. SZENTÁGOTHAI, I. TÖRŐ

REDIGIT
R. MAUCHA

TOMUS VI FASCICULI 1—2

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
BUDAPEST, 1955

ACTA BIOL. HUNG.

ACTA BIOLOGICA

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA BIOLÓGIAI KÖZLEMÉNYEI

SZERKESZTŐSÉG: BUDAPEST, IX., TŰZOLTÓ U. 58. KIADÓHIVATAL: BUDAPEST, V., ALKOTMÁNY U. 21.

Az *Acta Biologica* orosz, francia, angol és német nyelven közöl értekezéseket a biológia köréből.

Az *Acta Biologica* változó terjedelmű füzetekben jelenik meg, több füzet alkot egy kötetet.

A közlésre szánt kéziratok, géppel írva, a következő címre küldendők:

Acta Biologica szerkesztősége: Budapest, IX., Tűzoltó u. 58.

Ugyanerre a címre küldendő minden szerkesztőségi és kiadóhivatali levelezés.

Az *Acta Biologica* előfizetési ára kötetenként belföldre 80,— Ft, külföldi címre 110,— Ft. Megrendelhető a belföld számára az *Akadémiai Kiadónál* (Budapest, V., Alkotmány utca 21. Bankszámla 04-878-111-46), az Akadémiai Könyvesboltban (Budapest, Váci utca 22.), a külföld számára a «*Kultúra*» Könyv és Hírlap Külkereskedelmi Vállalatnál (Budapest, VI., Sztálin út 21. Bankszámla: 43-790-057-181), vagy külföldi képviseleteinél és bizományosainál.

«*Acta Biologica*» публикует трактаты из области биологии на русском, французском, английском и немецком языках.

«*Acta Biologica*» выходит отдельными выпусками разного объема. Несколько выпусков составляют один том.

Предназначенные для публикации рукописи (в напечатанном на машинке виде) следует направлять по адресу:

Acta Biologica, Budapest, IX., Tűzoltó u. 58.

По этому же адресу направлять всякую корреспонденцию для редакции и администрации.

Подписная цена »*Acta Biologica*« — 110 форинтов за том. Заказы принимает предприятие по внешней торговле книг и газет «*Kultúra*» (Budapest, VI., Sztálin út 21. Текущий счет №: 43-790-057-181) или его заграничные представительства и уполномоченные.

INDEX AUTORUM

A

Ábrahám, A. 31

B

Balázsy, L. 133

C

Csaba, Gy. 273, 361, 369

F

Felföldy, L. J. M. 325
Ferenczy, L. 317

G

Gellért, J. 77, 337
Gere, G. 257
Gimesi, N. I. 7, 113
Guba, E. 279

H

Hajóssi, Gy. 279
Hórtobágyi, T. 203

I

Iskum, M. 273

J

Juhász, I. 171

K

Kardos, J. 19
Kis Bagoly, R. 19
Kiss, I. 231
Krámli, A. 1, 185. 193, 197

L

Lantos, J. 1, 185, 193

P

Párducz, B. 289
Pozsár, B. I. 113

S

Stur, J. 1, 185
Szabó, A. 197
Székely, Gy. 215
Szende, K. 365
Szentágothai, J. 215

V

Vadász, J. 171

W

Woynárovich, E. 149

INDEX

KRÁMLI, A.—LANTOS, J.—STUR, J. Die Wirkung von Redoxsystemen auf den Stoffwechsel von Mikroorganismen. I. Die Wirkung des C-Hämins auf die Atmung der Hefe — Действие окислительно-восстановительных систем на обмен веществ микроорганизмов. I. — The action of redox-systems on the metabolism of microorganisms 1

GIMESI, N. I. Kolloidchemie der Hämateinate und ihre Rolle in der Mikrotechnik — Коллоидная химия гематеинатов и их роль в микротехнике — The colloidal chemistry of hemateinates and their role in microtechnics 7

KARDOS, J.—KIS BAGOLY, R. Studies on the extracellular developmental possibilities of mitochondria in the cells of plants — Исследования возможностей внеклеточного развития митохондрий растительных клеток — Untersuchungen über die extrazelluläre Entwicklungsmöglichkeiten der Mitochondrien der pflanzlichen Zelle 19

ÁBRAHÁM, A. Microscopic innervation of the cornea with reference to the neural connections of the fibrocytes — Микроскопическая иннервация роговицы с особым учетом нервных связей фиброцитов — Die mikroskopische Innervation der Hornhaut mit Rücksicht auf die Nervenverbindungen der Fibrozyten 31

GELLÉRT, J. Die Ciliaten des sich unter der Flechte *Parmelia saxatilis* MASS. gebildeten Humus — Инфузории гумуса, образовавшегося под лишайником *Parmelia saxatilis* MASS. — The ciliates of the humus under the lichen *Parmelia saxatilis* MASS. 77

GIMESI, N. I. — POZSÁR B. I. About the physiology of protoplasmic movements — О физиологии движения цитоплазмы — Über die Physiologie der Zytoplasmabewegung 113

BALÁZSY, L. Experimentelle Beeinflussung der Gewebequalität des Amputationsstumpfes — Экспериментальное воздействие на качество ткани ампутационной культи — Experiments influencing the quality of the tissue of the amputation stump 133

WOYNÁROVICH, E. Biologische Beobachtungen im Zusammenhange mit der künstlichen Züchtung von Fischen — Биологические наблюдения в связи с искусственным размножением рыб — Biological observations in connection with the artificial propagation of fish 149

VADÁSZ, J. — JUHÁSZ, I. Plasma globules arising from *Salmonella enteritidis* under the influence of penicillin and their reversion to the original bacillary form — Образование плазматических шариков из *Salmonella enteritidis* под действием пенициллина и их регенерация в клеточную форму — Die Bildung von Plasmakugeln aus *Salmonella enteritidis* auf Wirkung von Penicillin und deren Rückblildung in bazilläre Form 171

KRÁMLI, A.—LANTOS, J.—STUR, J. Die Wirkung von Redoxsystemen auf den Stoffwechsel von Mikroorganismen. II. Redoxpotential-Untersuchungen am Hefe-C-Hämin-komplex — Действие окислительно-восстановительных систем на обмен веществ микроорганизмов. II. Исследования окислительно-восстановительного потенциала в комплексе дрожжей-С-гемина — The action of redox-systems on the metabolism of microorganisms. II. Oxydation-reduction potential investigations on the yeast-C-haemine-complex 185

KRÁMLI, A.—LANTOS, J. Die Wirkung von Redoxsystemen auf den Stoffwechsel von Mikroorganismen. III. Einwirkung von Thioglykolsäure auf die Ergosterinproduktion in Hefekulturen — Действие окислительно-восстановительных систем на обмен веществ микроорганизмов. III. Влияние тиогликолевой кислоты на продукцию эргостерина в культурах дрожжей — The action of redox-systems on the metabolism of microorganisms. III. Effect of thioglycolic acid on the ergosterine production in yeast cultures 193

KRÁMLI, A.—SZABÓ, A. Die Wirkung von Redoxsystemen auf den Stoffwechsel von Mikroorganismen. IV. Veränderung der Riboflavinproduktion in geschüttelten Kulturen von *Eremothetium ashbyii* — Действие окислительно-восстановительных систем на обмен веществ микроорганизмов. IV. Изменение продукции рибофлавина во взболтанных культурах *Eremothetium ashbyii* — The action of redox-systems on the metabolism of microorganisms. IV. The change of riboflavine production in shaken cultures of *Eremothetium ashbyii* 197

HORTOBÁGYI, T. Algenteratologien im Seston des Balaton und ihre entwicklungsgeschichtlichen Beziehungen — Случаи тератологии водорослей из сестона оз. Балатон и их значение в истории развития — Les algues tératologiques dans le seston du Lac Balaton et leur importance du point du vue de l'évolution 203

SZENTÁGOTHAI, J.—SZÉKELY, GY. Zum Problem der Kreuzung von Nervenbahnen — О проблеме перекрещивания нервных путей — On the problem concerning the decussation of nerve pathways 215

KISS, I. Das Entstehen von Zellen aus Plasmateilchen pflanzlicher Mikroorganismen — Преобразование плазматических частиц растительных микроорганизмов в клетки — The development into cells of the plasma particles of plant microorganisms 231

GERE, G. The examination of the feeding biology and the humificative function of Diplopoda and Isopoda — Исследование биологии питания Diplopoda и Isopoda и их роли в гумификации — Untersuchung der Ernährungsbiologie der Diplopoden und Isopoden und ihre Rolle in der Humifikation 257

CSABA, GY.—ISKUM, M. Reaction of newborn rats to the heterologous transplanataion of Ehrlich's mouse-ascites tumour — Реакция новорожденных крыс на гетеротрансплантацию асцитической опухоли Эрлиха белой мыши — Reaktion der neugeborenen Ratten auf die heterologe Überimpfung des Ehrlichschen Ascites-Tumors der Maus 273

HAJÓSSI, GY.—GUBA, F. Das submikroskopische Zellmembran von *Endamoeba blattae* BÜTSCHLI — Субмикроскопическая клеточная оболочка у *Endamoeba blattae* BÜTSCHLI — Submicroscopic cell-membrane of *Endamoeba blattae* BÜTSCHLI 279

PÁRDUC, B. Reizphysiologische Untersuchungen an Ziliaten. IV. Über das Empfindungs- bzw. Reaktionsvermögen von *Paramecium* — Исследование физиологии возбуждения ресничатых инфузорий. IV. Возбудимость туфельки *(Paramecium)* — Studies on the reactions to stimuli in the ciliate infusoria. IV. On the power of response to stimuli of *Paramecium* 289

FERENCZY, L. Occurrence of antibacterial compounds in seeds and fruits — Антибактериальные вещества в семенах и плодах — Vorkommen von antibakteriellen Verbindungen in Samen und Früchten 317

FELFÖLDY, L. J. M. Effect of narcotics and other poisons on the water retaining capacity of detached leaves — Действие наркотиков и других ядов на водоудерживающую способность оторванных листьев — Die Wirkung von Narkotika und anderen Giften auf die Wasserzurückhaltung von gepflückten Blättern 325

GELLÉRT, J. Ciliaten des sich unter dem Moosrasen auf Felsen gebildeten Humus — Инфузории гумуса, образовавшегося под мхами на скалах — The ciliates of the humus under the moss-turf on rocks 337

COMMUNICATIONES BREVES

CSABA, GY. Three phases in the life of heterotransplants..... 361

SZENDE, K. Physiological aspects of a rough form of *Ustilago maydis*..... 365

CSABA, GY. Employment of anti-antisera for the reduction of incompatibility provoked by heterotransplanation 369

ACTA BIOLOGICA

ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS

A. ÁBRAHÁM, B. FALUDI, B. GYŐRFFY, L. HARANGHY, I. SZÖRÉNYI,
J. SZENTÁGOTHAI, I. TÖRŐ

REDIGIT

R. MAUCHA

TOMUS VI

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
BUDAPEST, 1956

DIE WIRKUNG VON REDOXSYSTEMEN AUF DEN STOFFWECHSEL VON MIKROORGANISMEN

I. DIE WIRKUNG DES C-HÄMINS AUF DIE ATMUNG DER HEFE

A. KRÁMLI, JUDIT LANTOS und JUDIT STUR

CHEMISCHES UND BIOCHEMISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, SZEGED
(VORSTAND: A. KRÁMLI)

(Eingegangen am 28. Januar 1954)

Zusammenfassung

Von den an Hefekulturen gebundenen Eisenporphyrinsystemen bewirkt das C-Hämin eine beträchtliche Steigerung der endogenen Respiration und parallel hiermit wird das Redoxpotential des Systems verändert; es ist also der zwischen Redoxpotential und Atmung bestehende enge Zusammenhang einwandfrei messbar.

Einleitung

Auf die biologische Bedeutung der Verbindungen vom Hämintyp hat zuerst GROSSBERGER [5] hingewiesen, der beobachtete, dass das Hämin für das Wachstum zahlreicher Mikroorganismen im allgemeinen unentbehrlich ist. Später teilte DAVIS [2] mit, dass *B. haemophilius influensae* zumindest zweier Faktoren bedarf, die nach dem Vorschlag von THJÖTTAS [9] dann als Faktor X und V bezeichnet wurden. Von dem X-Faktor stellte sich später heraus, dass er eigentlich mit dem Hämin identisch ist. Nach LWOFF [8] ist das Hämin auch für das Leben und die Fortpflanzung aërober Bakterien und vieler Trypanosomen unbedingt erforderlich. EULER und ERIKSSON [4] fanden bei der Prüfung der Hefe auf ihren Eisengehalt, dass nach Zugabe von Eisensulfat während des Versuches der Gesamteisengehalt zunimmt und proportional damit das Hämineisen abnimmt. Parallel hiermit lässt auch die Atmung nach.

Das Eisenatom des Hämins ist autoxydabel und vermag infolge der Valenzveränderung des Eisens die Sauerstoffübergabe zu katalysieren. KUHN und MEYER [7] versuchten, die Oxydation vieler auch biologisch wichtiger Stoffe mit Hämin zu katalysieren. Dies gelang ihnen auch bei ungesättigten Fettsäuren, Polyen-Farbstoffen vom Karotintyp und im Falle des Ergosterins. Die Oxydation der Kohlenhydrate wird durch Hämin nicht beeinflusst, während Enolbrenztraubensäure die Sauerstoffaufnahme beschleunigt. Nach KUHN sind zur Entfaltung der katalytischen Wirkung ungesättigte Bindungen nötig.

WARBURG [10] hat die katalytische Wirkung des Hämins an kernlosen Erythrozyten untersucht, deren Oberfläche nämlich nicht völlig für die Oxydation ausgenützt wird und fand, dass manche Stoffe vom Hämintyp die Atmung der roten Blutkörperchen auf das 20fache zu steigern vermögen. Die Kata-

lyse ist seines Erachtens eine oberflächliche, da sie durch Narkotika gehemmt werden kann. Eine Hemmung kommt auch durch Kohlenmonoxyd zustande.

Neuere Ergebnisse auf dem Gebiete der Antibiotikumforschung weisen ebenfalls darauf hin, dass der Stoffwechsel der Mikroorganismen im Falle geringer Veränderungen der Redoxverhältnisse grundlegend verändert wird. Besonders auffallend ist diese Veränderung bei der Züchtung von Streptomyces griseus-Kulturen in Eisenfermentoren, wo sie hauptsächlich in den Schwankungen der Streptomycinproduktion zum Ausdruck kommt.

Auf Grund dieser Literaturangaben und der obigen Feststellungen nahmen wir an, dass mit Hilfe des Hämins oder anderer ähnlicher Stoffe, die als zellgebundene Redoxsysteme funktionieren können, auch willkürlich Abänderungen bzw. Steigerung des Stoffwechsels, resp. der Oxydationsfähigkeit gewisser Organismen durchführbar sein müssten. Zur Entscheidung der Frage empfiehlt sich — besonders in Anbetracht der leichten Zugänglichkeit des Versuchsmaterials und der Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse — der Hefe-Häminkomplex als Modellversuch als am weitgehendsten geeignet. Unsere Untersuchungen bezweckten die Erforschung des von Eisenporphyrinsystemen auf die Atmung der Hefe ausgeübten Effektes.

Im ersten Teil unserer Versuche gelangte als Oxydationskatalysator Chlorhämin zur Anwendung, das aber wasserunlöslich ist und nur in alkalischem Medium in Lösung übergeht. Nach diesen Versuchen wird die Hefeatmung durch Chlorhämin nicht nachweisbar beeinflusst bzw. es ergeben sich sehr abweichende Resultate, was der hochgradigen Assoziation der Moleküle zuzuschreiben sein dürfte.

Aus diesem Grunde benutzten wir in unseren weiteren Versuchen wasserlösliches C-Hämin und gelangten zu folgenden Feststellungen:

1. In der ersten Versuchsreihe wurde untersucht, inwiefern die Atmung der Hefesuspension durch das C-Hämin beeinflusst wird. Beim Vergleich des Sauerstoffverbrauches des Hefe-Häminsystems mit dem einer gleichen Bedingungen unterstehenden, Hämin aber nicht enthaltenden Hefesuspension fanden wir, dass das Hämin die Hefeatmung gleich zu Versuchsbeginn auf etwa das 10fache erhöht (Abb. 1).

2. Die Änderung des Hefe-Häminverhältnisses geht auch mit einer Veränderung der Atmungsgeschwindigkeit einher. Bei einem Hämin-Hefe-Verhältnis von 1 : 180, d. h. wenn das Hämin 0,0125-tel der Hefemenge beträgt, steigt die Atmung bereits in der ersten Stunde auf etwa das 10-fache. Wird dieses Verhältnis auf 1 : 160 reduziert, ist die Atmungssteigerung ebenfalls noch nachweisbar, d. h. nach Zugabe von 0,0015g Hämin zu 1 g Hefe kommt es noch zu einer wahrnehmbaren Wirkung (Abb. 2).

3. Um zu entscheiden, ob es sich bei der gesteigerten Atmung nicht um einen Peroxydaseeffekt handelt, haben wir das Hämin 10 Minuten lang bei 100° C gekocht, aber auch so blieb die Aktivität in vollem Umfange erhalten.

Durchwaschen der Hefe in physiologischer NaCl-Lösung liess das Ergebnis unbeeinflusst.

Gleichzeitig mit den Atmungsversuchen wurde in einer anderen Versuchsreihe untersucht, welche Änderung der Redoxpotentialwert erfährt, wenn der Hefesuspension verschiedene Mengen Hämin zugesetzt werden.

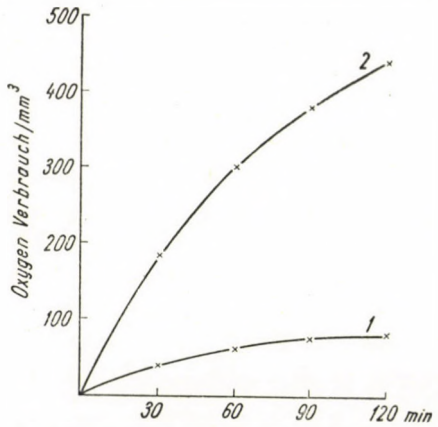


Abb. 1. Veränderung der Hefeatmung auf die Wirkung von C-Hämin. 1. Endogene Atmung der Hefe. 2. Hefeatmung nach Zugabe von 75 γ C-Hämin (Hefekonzentration: 0,012 g Trockensubstanz/3 ml Kultur)

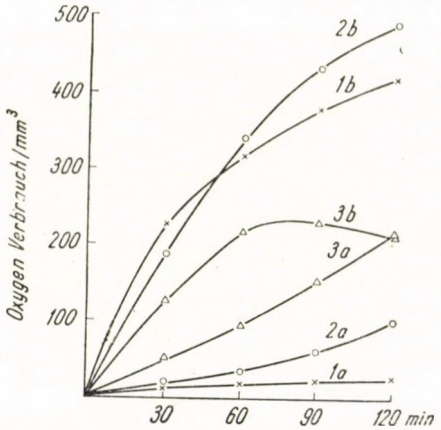


Abb. 2. Die Atmung verschieden konzentrierter Hefekulturen auf die Wirkung von C-Hämin. 1a. Endogene Atmung der Hefe (0,06 g Ttrockensubstanz/3 ml Kultur). 1b. Veränderung der Atmung nach Zugabe von 75 γ Hämin. 2a. Endogene Atmung der Hefe (0,012 g Trockensubstanz/3 ml Kultur). 2b. Veränderung der Atmung nach Zugabe von 75 γ Hämin. 3a. Endogene Atmung der Hefe (0,024 g Trockensubstanz/3 ml Kultur). 3b. Veränderung der Atmung nach Zugabe von 75 γ Hämin

Ein Vergleich der mit der Zeit in Erscheinung tretenden Veränderung des Redoxpotentials des Hefe-Häminkomplexes mit den unter ähnlichen Bedingungen gehaltenen Atmungen ergibt, dass die Herabsetzung des Redox-

potentials mit dem Anwachsen der Atmungsintesität auf das engste zusammenhängt: während das Potential der Hefesuspension um 140 mV gesunken ist, hat die atmungssteigernde Wirkung des Hämins ihren Höhepunkt erreicht. Nun beginnt das Potential etwa 30 Minuten lang allmählich zu sinken, um dann wieder anzusteigen und während dieser Zeit ist die Atmungssteigernde Wirkung weniger ausgesprochen. Nach etwa 2 Stunden stellt das Potential sich auf einen konstanten Wert ein, der aber um 20 mV niedriger ist als der Ausgangswert (Abb. 3). Obzwar die Atmung zu dieser Zeit schon etwas nachzulassen beginnt, ist sie dennoch immer höher als die der häminfreien Hefe.

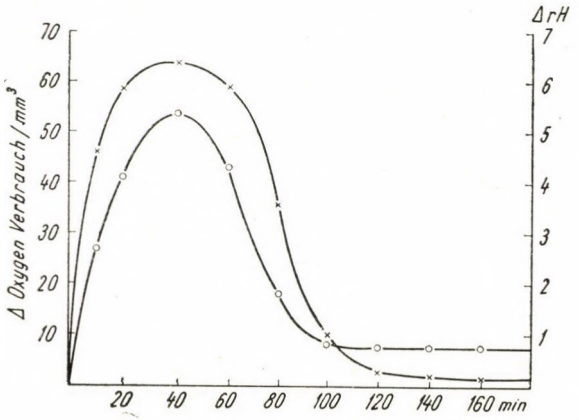


Abb. 3. Zusammenhang zwischen Atmung und rH-Veränderung der Hefekulturen bei der C-Hämin behandlung. 1. Veränderung der Atmungskurve auf die Wirkung von 75 γ C-Hämin. 2. Veränderung des rH der Hefe auf die Wirkung von 75 γ C-Hämin (Hefekonzentration: 0,006 g Trockensubstanz/3 ml Kultur)

Schliesslich wurde auch untersucht, bei welchem pH die Hefezelle die grösste Aktivität gegenüber Hämin entfaltet und wurde in der Nähe des neutralen Punktes am intensivsten gefunden.

Methodik und Versuchsergebnisse

Die zu den Untersuchungen benutzte reine Bäckerhefe III. Generation bezogen wir aus der Budafoker Spiritus- und Hefefabrik. Nach gründlichem Auswaschen in physiol. Kochsalzlösung wurden jeweils die entsprechenden Suspensionen hergestellt.

Das Chlorhämin wurde auf die bekannte Weise [11] aus Rinderblut hergestellt und durch mehrmaliges Umlkristallisieren gereinigt. Das C-Hämin wurde nach der Vorschrift von BARKAN und SCHALES ebenfalls aus Rinderblut isoliert und das so erhaltene Produkt im Beckmann-Spektrophotometer identifiziert, indem die hämochromogene Reaktion mit Pyridin vorgenommen und die Extinktion der erhaltenen Lösung bei 1 cm Schichtdicke zwischen 500—600

Millimikron untersucht wurde. Die gefundenen zwei Maxima, ein stärkeres bei 533,2 und ein schwächeres bei 522,2 Millimikron, entsprechen den Literaturdaten.

Die Konzentration der C-Häminlösung wurde nach DE SNELL [3] auf Grund ihres Eisengehaltes bestimmt. Das Eisen wurde aus dem Hämin mit Wasserstoffsuperoxyd abgespalten, mit Hydroxylamin zur Ferroform reduziert und die Farbintensität des mit Orto-Phenantrolin gebildeten Komplexes im Pulfrich-Photometer bei 1 cm Schichtdicke mittels S 52-Farbenfilter kolorimetrisch bestimmt. Die nach BARKAN und SCHALES [1] zubereitete C-Häminlösung enthält grosse Mengen Eiweiss, welches mit Trichloressigsäure ausfällbar ist. Um etwaige Störungen durch das vorhandene Eiweiss zu vermeiden, haben wir die Lösung durch Zugabe von Trichloressigsäure (bis zu etwa 10%) enteiweisst. Hierbei wird das Hämin von dem ausgefällten Eiweiss adsorbiert, so dass die Lösung selbst häminfrei wird. Die Eluierung des adsorbierten Hämins aus dem zentrifugierten, gewaschenen Niederschlag geschah mit 96%igem Alkohol, in dem es völlig in Lösung geht. Nach Versetzen mit Wasser wurde die alkoholische Lösung auf dem Wasserbade eingedampft. Nach dem Austreiben des Alkohols lag das Hämin in amorphem Zustand vor. Die überschüssige Trichloressigsäure wurde durch mehrfaches Dekantieren und Waschen entfernt, das Hämin schliesslich in Natriumhydroxyd gelöst und mit Salzsäure neutralisiert. Die Konzentration der Lösung wurde kolorimetrisch kontrolliert.

Die Atmungsversuche wurden nach der WARBURGschen Methode durchgeführt. In je ein Gefäss wurden insgesamt 3 ml in Phosphatpuffer (pH 7) hergestellte Flüssigkeit gegeben, 1 ml davon war stets stabile Hefesuspension, während die Menge des Phosphatnährbodens und des übrigen Substrates variierte.

Weitere Versuche sollten entscheiden, ob unter den obigen Bedingungen das Hämin von der Hefe gebunden und ob die Bindung nach einer gewissen Zeit gelöst wird bzw. ob die Bindungsstärke vom pH abhängig ist.

Bei der Bestimmung wurden benützt :

1. C-Häminlösung : 150 γ/ml

2. Hefe : dreimal mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und dann mit physiol. Phosphatpuffer (pH 7,0) suspendiert. Die Konzentration wurde mittels Trockensubstanzbestimmungen kontrolliert (in 10 ml 0,323 g).

Nach dem Abzentrifugieren der 10 ml Hefesuspension erfolgte Schütteln des Sedimentes mit 300 γ in 2 ml Puffer gelöstem Hämin und nach dem Zentrifugieren Bestimmung des Hämingehaltes aus dem klaren Teil der Lösung. Die Differenz zwischen dem eingetragenen und dem im Filtrat bestimmten Hämin ergibt die Menge des gebundenen Hämins.

Es zeigte sich, dass bei pH 7,0 ein Gramm Hefe 374,5 γ Hämin bindet und bei pH 4,0 diese Menge quantitativ freigibt. 36 Stunden bei pH 7,0 gehalten gibt die Hefe 283,7 γ Hämin frei, 9,8 γ bleiben also auch noch nach 36 Stunden

gebunden. Demnach ist die Häminbindung einerseits vom pH und anderseits von der Zeit abhängig. Bestimmung des Hämingehaltes ähnlich wie oben.

Redoxpotentialuntersuchungen. Zu den Messungen wurde in physiologischem Phosphatpuffer (pH 7,0) suspendierte Hefe verwendet. Die Potentialmessungen geschahen im Metrohm-Titriskop mittels einer Platinelektrode gegenübergeschalteten gesättigten Kalomelelektrode. Die Versuchsbedingungen wurden so gewählt, dass sie denen der Atmungsversuche gleichkamen, weshalb bei offenem System gearbeitet und durch einen magnetischen Rührer für gute Durchlüftung gesorgt wurde.

LITERATUR

1. Barkan, G., Schales, O. (1937) Ein wasserlösliches c-Hämin aus Blut. *Z. physiol. Chem.*, **246**, 181—193.
2. Davis, W. A. (1917) *J. Inf. Dis.*, **21**, 392.
3. De Snell, F. (1949) Colorimetric methods of analysis. II. Van Nostrand Co., New York.
4. Euler, H., Eriksson, Ester (1928) Enzyme und Bi'okatalisatoren bei Anpassung und Vererbung. I. Beeinflussung einer Hefe durch Vorbehandlung in Fe-haltigen Nährlösungen. *Z. physiol. Chem.*, **178**, 39—51.
5. Grossberger, R. (1897) Beiträge zur Bakteriologie der Influenza. *Z. Hyg. Infekt.*, **25**, 453—476.
6. Krámli, A. (1952) Mikrobiológiai módszerek jelentősége a gyógyhatású anyagok gyártásánál. Die Bedeutung der mikrobiologischen Methoden bei Herstellung von Pharmaka. *Magyar Tud. Akad. Orvosi Oszt. Közl.*, **3**, 79—88. (Ungarisch.)
7. Kuhn, R., Meyer, K. (1929) Über katalytische Oxidationen mit Hämin. *Z. physiol. Chem.*, **185**, 193—216.
8. Lwoff, A. (1948) Les hématines considérées comme facteurs de croissance. Les antihématines. *Bull. Soc. Biol. Chem.*, **30**, 817—835.
9. Thjötta, T. (1921) Studies on bacterial nutrition. I. Growth of Bacillus influenzae in haemoglobin-free media. *J. Exp. Med.*, **33**, 763—771.
10. Warburg, O., Kubowitz, F. (1930) Über katalytische Wirkung von Bluthäminen und von Chlorophyll-Häminen. *Biochem. Z.*, **227**, 184—199.
11. Willstätter, R., Fischer, M. (1913) Untersuchungen über den Blutfarbstoff. I. Über den Abbau des Hämins zu den Porphyrinen. *Z. physiol. Chem.*, **87**, 423—498.

ДЕЙСТВИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ СИСТЕМ НА ОБМЕН ВЕЩЕСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ I.

Из связанных к дрожжевым культурам систем железопорфиринов С-гемин вызывает значительное повышение эндогенного дыхания, и параллельно с этим изменяется окислительно-восстановительный потенциал системы; таким образом дается возможность с уверенностью измерять тесную связь между окислительно-восстановительным потенциалом и дыханием.

THE ACTION OF REDOX-SYSTEMS ON THE METABOLISM OF MICROORGANISMS I

A. Krámli, J. Lantos, J. Stur

Out of the iron-porphyrin systems bound to yeast cultures, C-hemin produces a considerable increase of the endogenous respiration and parallel with it the redox-potential of the systems undergoes a change. Thus the close correlation between redox-potential and respiration is incontestably measurable.

András Krámli, Szeged, Tömörkény u. 2/c. Ungarn.
Judit Lantos, Szeged, Somogyi u. 6. Ungarn.
Judit Stur, Szeged, Bokor u. 7. Ungarn.

KOLLOIDCHEMIE DER HÄMATEINATE UND IHRE ROLLE IN DER MIKROTECHNIK

N. I. GIMESI

WISSENSCHAFTLICHES LABORATORIUM DES BOTANISCHEN GARTENS DER UNIVERSITÄT, BUDAPEST
(VORSTAND: N. I. GIMESI)

Zur Veröffentlichung zusammengestellt von B. I. POZSÁR

(Eingegangen am 26. März 1954)

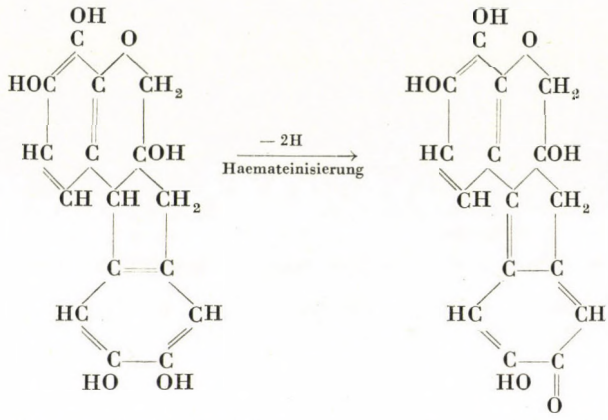
Zusammenfassung

1. Salze von starken Laugen und starken Säuren (neutrale Salze) bilden keine Farbstoffe-
2. Hydroxyde von einwertigen Alkalimetallen (Lithium-, Natrium-, Kalium-, Ammonium, Hydroxyd) geben Farbstoffe neutraler Ladung mit molekularer Dispersion.
3. Calcium- und Barium-Hämateinate bilden einen übergangscharakter zwischen den molekularen und kolloidalen Eigenschaften. Die zur Kolloidbildung neigende Tendenz der Calcium- und Barium-Hämateinate wird durch die geringere Löslichkeit ihrer Salze begründet.
4. Da Aluminiumsulfat, Ferrichlorid und Kaliumchromat gut hydrolisieren, ergeben sie in sauren Lösungen Farbstoffe molekularer Dispersion. In neutralen und basischen Lösungen, ferner bei Elektrophorese koaguliert sich der Farbstoff genau so wie bei höheren hydrolysierenden Salzkonzentrationen.
5. Die positive Ladung erhält das Aluminium-Hämateinat durch das freie phenolartige Hydroxyl und das dissoziable Hydrogen des durch Sulfurieren (Isohämateinat) entstandenen Derivates.

Einleitung

Es ist allgemein bekannt, dass Hämatoxylin bzw. dessen Oxydationsprodukt, Hämatein zu den wichtigsten Kernfärbemitteln gehört. Die Leukoverbindung ist das Hämatoxylin ($C_{16}H_{14}O_6$), welches aus dem Blutholzbaum *(Hämatoxylon Campechianum L.)* gewonnen wird. Hämatoxylin kristallisiert sich mit 3 Mol. Kristallwasser im quadratischen, mit 1 Mol. Kristallwasser im rhombischen System. Über 120° C verliert es sein Kristallwasser. Sein Schmelzpunkt liegt über 140° C. Es löst sich in kaltem Wasser langsam, ist aber in warmem Wasser, Alkohol und Äther gut löslich. Die Fläche des polarisierten Lichtes dreht es nach rechts um. Nach WIESNER [10] bleibt Hämatoxylin — luft- bzw. wasserdicht geschützt — beständig.

Was nun die Struktur, die chemische Zusammensetzung des Hämatoxylin betrifft, muss man wissen, dass es im Schmelzprodukt von Kalilauge Pyrogallol (1—2—3 Trioxybenzol) und Protokatechusäure (3—4 Dioxybenzoesäure) liefert. Das Hämatoxylin-Molekül ergibt sich aus vier homozyklischen Ringen. Die Umwandlung des Hämatoxylins in Hämatein wird so angenommen, dass die im vierten Ring verlaufende Oxydation eine Chinonstruktur ergibt (Hämateinisierung).



Hämatoxylin ($C_{16}H_{14}O_6$) Hämatein ($C_{16}H_{12}O_6$)

Das Hämatoxylin oxydiert sich an der Luft, im Licht höchstens an der Oberfläche der Kristalle und auch dann sehr langsam. Die Rotfärbung ist das Zeichen der Hämateinisierung. Durch Einwirkung von Säuren werden beide Verbindungen gelb gefärbt. (Nach WIESNER wird Hämatoxylin, luftdicht verschlossen, auch beim Tageslicht rot.) Hämatoxylin wird in wässriger Lösung ziemlich schnell gelb, rot. Sehr wichtig ist der Umstand, dass die farblose oder nur hellgelbe, wässrige Lösung des Hämatoxylins sich durch Einwirkung von elektrischem Strom am negativen Pol rot färbt! Die an der negativen Elektrode vor sich gehende Farbveränderung ist nicht anders zu erklären, als dass durch Oxydation eine Chinonstruktur entsteht. Daraus folgt wiederum, dass Hämatoxylin einen sauren Charakter besitzt : es enthält fünf phenolartige Hydroxyle. Es dissoziiert nur schwach und langsam und die nachfolgende Oxydation ist die Reifung desselben : die Hämateinisierung. Wahrscheinlich verwandelt sich nicht das ganze Hämatoxylin und Hämatein wird immer etwas Hämatoxylin enthalten Hämatoxylin ist also als eine schwache Säure Hämatein aber als eine Säurerest zu betrachten. Wie wir sehen, ist Hämatein keine Salzfarbe ; es ist aber farbig, eine aromatische Verbindung und adsorbiert sich stark. Je mehr Benzolringe aber die aromatischen Verbindungen besitzen, desto stärker adsorbieren sie sich (KRUYT [7]). Dank diesem Umstand ist es ausser in der Mikrotechnik, auch in der Farbtechnik (Textilfarbtechnik) weitgehendst anwendbar. Die echten Farbstoffe (Lack) sind die Salze des Hämatoxylins : die Hämateinate. Zum Anfertigen von Farben eignet sich Hämatoxylin schon deshalb besser als Hämatein, da sich letzteres in Wasser schwer löst und man annehmen kann, dass es auch wegen seines höheren Oxydationsgrads stärker zur Aggregation neigt als Hämatoxylin. Ausserdem ist es sehr wichtig, dass die Farbmolekülen tiefer in die zu färbenden Zell- bzw. Kernteile dringen, was bei Agenten molekularer Grössenordnung am erfolgreichsten ist. Deshalb sind die aus reinem Hämatoxylin angefertigten Lösungen womöglich vor dem Färben zu ultrafiltrie-

ren, da Hämateinat mit Molekulardispersion viel leichter in die zu färbenden Gewebselemente diffundiert, als eventuell sein Aggregat. Es ist bekannt, dass nur die weniger als 45 Atome enthaltenden Farbmoleküle leicht durch die Kolloidmembrane diffundieren. Bei 55 und 70 Atomen ist die Wanderung schon langsamer und über 70 ist nichts mehr zu bemerken. Das Hämatoxylin-Molekül hat 35, Hämatein 33 Atome. Schon bei einem Aggregat mit nur zwei Molekülen wären wir bei der Grössenordnung von 68—70 Atomen und dadurch wären wir scharf an der Durchlässigkeitsgrenze der Kolloidmembrane ; das aber wäre bei mikrotechnische und andere diffusen Färbungen keinesfalls vorteilhaft. (KRUYT [7]).

Unsere Versuche richteten sich auf die Feststellung des kolloidalen Dispersionsgrades der Hämateinate. Es wurden die Bedingungen der Entstehung der Hämateinate und des Grades ihrer Dispersion untersucht, denn für die mikroskopischen Färbungen eignet sich die molekulare Grössenordnung am besten. Wir wollten die Eigenschaften der Hemateinate kennenlernen, um eine Erklärung für die in letzter Zeit überall angewandten Hämateinat-Kernfärbung zu bekommen.

Versuchsmaterial und Methoden

Bei den Versuchen wurde das 3 Mol. Kristallwasser enthaltende Hämatoxylin in 1/1000 Mol. Konzentration (0,358 g/l) gebraucht, da es farblos ist und sich in Wasser besser löst als Hämatein.

Es wurde untersucht, in Gegenwart welcher Katione und Anione aus der farbloser Hämatoxylinlösung Farbe entsteht ; und in welchen Konzentrationen diese angewandt werden müssen, um eine molekulare Dispersion der Lösung zu bekommen. Die Hämateinatbildung der neutralen Salze (Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Ammoniumchlorid, Calciumchlorid, Bariumchlorid, Magnesiumchlorid, Manganochlorid ; Natriumsulfat, Kaliumsulfat, Calciumsulfat, Magnesiumsulfat, Natriumnitrat, Kaliumnitrat, Calciumnitrat, Bariumnitrat, Strontiumnitrat, Cobaltonitrit), der Alkalihydroxyde (Kaliumhydroxyd, Natriumhydroxid, Ammoniumhydroxyd), der Erdalkalihydroxyde (Calciumhydroxyd, Bariumhydroxyd), der hydrolysierenden Salze (Aluminiumsulfat, Ferrichlorid, Kaliumchromat, Zinkchlorid) und der Anione (Schwefelsäure) wurden untersucht.

1. Beobachtet wurde, bei welchem Elektrolyt und bei welcher Konzentration desselben der Farbstoff entsteht und welche Farbe er hat.

2. Ob der entstandene Farbstoff bei der Elektrophore neutrale, positive oder negative Ladung hat. Die Untersuchungen wurden bei 4 Volt Spannung durchgeführt. Von ganz besonderer Bedeutung sind die Fälle, wo die Dispersion des Farbstoffes sich bei der Elektrophore verändert.

3. Die molekulare Dispersion wurde mit Hilfe eines Kollodiumsacks oder mit dem Gimesi-Ultrafilter geprüft! Es wäre schwer, die kolloidale Grössenordnung mit Zahlen zu bewerten, da die Porengrösse der Kollodium- bzw. Ultrafilter nicht reproduziert werden kann. Bei Verbindungen mit bekannter Molekülengrösse ist es aber möglich an ihrem Durchdringen bzw. Rückstand die Porengrösse abzuschätzen, und so wären sie zu relativen Vergleichen gut brauchbar. In mehreren Fällen konnte die einfache Dialysierung auch mittels Elektrodialyse kontrolliert werden.

Anfertigung und Gebrauch des Ultrafilters sind in früheren Arbeiten angegeben [2, 3, 4, 5]. Das Bereiten des Kollodium-Dialysatorsackes sei hier kurz mitgeteilt.

Ein Reagenzglas wird in ein Becherglas das 4%iges blasenfreies Kollodium enthält, so getauscht, dass die Flüssigkeit 8—10 cm Höhe erreicht. Nach ungefähr 10 Sek. wird das Reagenzglas herausgenommen und — nachdem der Überfluss abtropfte — mit der Öffnung nach unten gewendet, damit sich das Kollodium gleichmässig verteile. Danach wird das Glas solange in waagerechter Lage zugedreht, bis sich die Kollodiumhaut überall gleichmässig verteilt, die gleiche Dicke hat. Jetzt kommt das überzogene Glas für 1—2 Min. in destilliertes Wasser. Aus dem

Wasser genommen, wird es 3—5 Min. getrocknet. Der gut getrocknete Kollodiumüberzug wird in 80—90%igem Alkohol getaucht und dann mit sicherer Handbewegung abgezogen, nachdem der obere, fester am Glas haftende Teil abgeschnitten wurde. Sowie der Kollodiumüberzug vom Glas abgezogen ist, wird er mit einer entsprechenden Glasröhre 1—2 Min. zum Trocknen an der Luft aufgeblasen. Bis zum Gebrauch ist der Kollodiumsack in sterilem Wasser zu halten. Zur Füllung wird eine Pipette genommen, damit der Farbstoff nur auf den Grund des Sackes gelange und nicht etwa am Inneren der Wand emporwandere. Dann wird die Öffnung des Kollodiumsackes mit einer Holzklammer zusammengedrückt und so in destilliertes Wasser getaucht, dass das äussere Wasser nicht viel höher stehe als der Meniskus der inwendigen Farbe. Wenn innerhalb und ausserhalb des Sackes Platinelektroden angebracht werden, so kann man die Elektrodialyse anwenden. Die Säcke sind, wenn ausser Gebrauch, unbedingt in destilliertem Wasser zu bewahren, um ein Austrocknen zu verhindern, da sich ihre Brauchbarkeit sonst stark vermindert.

Versuchsergebnisse

Nicht eins der untersuchten neutralen Salze gab mit Hämatoxylin von 1/1000 Mol. Konzentration ein solches Reaktionsprodukt, dass auf Grund seiner Farbveränderung eine eingehendere Untersuchung sich verlohnt hätte.

Die Hydroxyde der Alkalimetalle (Natriumhydroxyd, Kaliumhydroxyd, Ammoniumhydroxyd) ergaben eine lebhafte violett-rote Färbung und auch in sehr hoher Konzentration entstand kein kolloidaler Niederschlag. Hämateinate der Alkalimetalle sind sehr leicht und gut von den ersten Oxydationsprodukten des Hämatoxylin zu unterscheiden. Im Laufe der Hämateinisierung tritt nämlich eine gelbe-gelblichbraune-kirschrote Verfärbung ein, die Salze der Alkalimetalle dagegen bewirken, dass die violett-rote Farbe dominiert. Letzteres konnte sowohl am Kollodium als auch am Ultrafilter kontrolliert werden. In relativer Kenntnis der Porengrösse konnte festgestellt werden, dass Hämateinat mit einem Molekül entsteht. Der dialysierte Farbstoff ist elektrophoretisch indifferent, bewegt sich also weder zum positiven, noch zum negativen Pol. Wenn im Reaktionsgemisch auch bisher noch unveränderte Komponente vorkommen, dann bewirkt der elektrische Strom, dass die Kationen zum negativen Pol wandernd, mit dem dort anwesenden Hämatoxylin eine chemische Reaktion eingehen. Es kann also nur eine erhöhte Farbstoffentstehung am negativen Pol beobachtet werden, diese Erscheinung ist aber auf keinen Fall als ein elektroforetisches Wandern des fertigen Farbstoffes zu betrachten.

Auch die Wirkung der Hydroxyde von zweiwertigen Metallen (Calciumhydroxyd, Bariumhydroxyd) wurde untersucht. Beide reagieren mit Hämatoxylin und Hämatein und dadurch entsteht die für die Alkalimetalle charakteristische Farbe. Auch reagieren sie auf die polarisierende Einwirkung von elektrischem Strom bei der Elektrophorese indifferent. Der entstandene Farbstoff kann nur teilweise dialysiert bzw. durch den Ultrafilter durchgesaugt werden; es kommt also sowohl die molekulare als auch die kolloidale Dispersion vor. Wenn Calcium- oder Bariumhämateinat Alkalilauge zugesetzt wird, dann koaguliert sich der Farbstoff.

Von den hydrolysierenden Salzen wird hier die Wirkung des Aluminiumsulfates, des Ferrichlorids und des Kaliumchromates behandelt, wobei die Umstände der Farbstoffentstehung beachtet werden. Aluminiumsulfat hidrolysiert vollständig.

$$Al_2(SO_4)_3 + 6H_2O \longrightarrow 2Al(OH)_3 + 3H_2SO_4$$

(Zur Bereitung von «Hämalaun» wird in der Regel Alaun $[K_2Al_2(SO_4)_4]$ verwendet, die Anwesenheit des Doppelsalz-Komponenten, (vom Doppelsalz) des Kaliumsulfates, hat aber keine Bedeutung, da dieses Salz kein Hämateinat bildet. Der entstehende blaue Farbstoff diffundiert sehr rasch, ist also von molekularer Dispersion. Wird der Farbstoff mit alkalischen Laugen titriert, so gewinnt man ein unlösliches, irresolubles Koagulat. Der nach der Ausflockung ultrafiltrierte Farbstoff ist neutral. Der molekulare Farbstoff hat positive Ladung, da er zum negativen Pol wandert und sich, ähnlich dem Eisenhämateinat, koaguliert.

Ferrichlorid hydrolysiert stark :

$$FeCl_3 + 3H_2O \longrightarrow Fe(OH)_3 + 3HCl$$

Das entstehende Eisenhämateinat ist trotz des charakteristischen kolloidalen Zuges des reagierenden Eisenhydroxydes ebenfalls molekular. Der frisch hergestellte Farbstoff lässt sich gut filtrieren, adsorbiert sich später an der Wand des Filters und koaguliert endlich. Der blaue Farbstoff dringt in Anwesenheit von Salzsäure vollständig durch den Dialysiersack und den Ultrafilter, ist also von molekularer Dispersion! Wichtig ist die Beobachtung, dass Eisenhämateinat bei Elektrophorese zum negativen Pol wandert und sich dort koaguliert. Durch Zugabe von ein wenig Salzsäure erfolgt die Koagulation des frisch angefertigten Eisenhämateinats erst viel später.

Auch Kaliumchromat ist ein gut hydrolysierendes Salz

$$K_2CrO_4 + 2H_2O \longrightarrow H_2CrO_4 + 2KOH$$

und gibt mit Hämatoxylin reagierend eine sehr intensive Farbstoffbildung. Farbe und Dispersion des Farbstoffes hängt von der Konzentration des Kaliumchromates ab. Zu 10 ml 1/1000 Mol. Hämatoxylin wurde in gesonderten Proben mit steigenden Mengen 1, 2, 3, ... 19, 20 ml 1/1000 Mol. Kaliumchromat gegeben. In den ersten neun Proben ist der Farbstoff violettrot und hinterlässt am Ultrafilter kaum einen Niederschlag. Aufwärts von zehn bis zwanzig dagegen ist der entstandene Farbstoff (dunkel) blau und seine Koagulation vollzieht sich im Dunkel. Bei Elektrophorese wandert er zum negativen Pol. Die Beschaffenheit des Farbstoffes ist also eine andere als die des durch Kaliumhydroxyd entstandenen Kaliumhämateinate.

Die Hydrolyse des untersuchten Zinkchlorides ist nur eine teilweise

$$ZnCl_2 + H_2O \longrightarrow ZnClOH + HCl$$

und entsteht ein schönes blaues Zinkhämateinat mit kolloidaler Dispersion. Es ist nur nach Zugabe von Salzsäure im molekularen Zustand haltbar. Die Sulfate von Eisen, Nickel und Kupfer, ferner das Natriumphosphat ergaben kolloide Farbstoffe. Sie stimmten in allem mit Ferrichlorid, Kaliumchromat, Aluminiumsulfat überein.

Merkwürdig ist, dass Lithium-, Natrium- und Kaliumcarbonat sehr schöne, violette, dauerhafte, sich nicht niederschlagende Farbstoffe positiver Ladung ergaben.

Endlich müssen noch die Isohämateinate erwähnt werden. Sie entstehen auf Einwirkung von *cc* Schwefelsäure als dunkelrötlich-braune Farbstoffe, die sich nach längerem Stehen in glänzend gelben Säulen kristallisieren. Der entstandene Farbstoff hat positive Ladung.

Das Ergebnis der Sulfurierung kann als Isohämateinatbildung betrachtet werden. Die entstandene Farbe hat positive Ladung, was sich durch die Anwesenheit von freiem Hydrogenion erklärt.

Auswertung der Versuchsergebnisse

Zwischen den Salzen starker Säuren und starker Basen, ferner dem als eine schwache Säure zu betrachtenden Hämatoxylin vollzieht sich keine chemische Reaktion, wie das auch gar nicht zu erwarten ist.

Die neutrale Salzbildung starker Basen ist von grosser Bedeutung. Es ist von der im Hämatoxylin entstehenden Salzbildung der phenolartigen Hydroxylionen die Rede. Bei der Bildung der Farbe ist ausser der Salzbildung auch der Verlauf der Chinonentstehung wichtig, nachdem WIESNER [10] aus Hämatoxylin im Vakuum farbloses Hämateinat erzeugte. Eben durch diesen Versuch wird es wahrscheinlich, dass an der Salzbildung nur vier phenolartige Hydroxyle teilnehmen, und das fünfte Hydroxyl am vierten Ring bei der Chinonisierung eine wichtige Rolle spielt. Da Hämatoxylin positive Ladung hat, Alkalihämateinat elektrophoretisch neutral ist und sich gleichzeitig auch die Farbenreaktion einstellt, kann vorausgesetzt werden, dass in den Alkalihämateinaten alle, also die vier freien phenolartigen Hydroxyle gebunden sind.

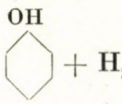
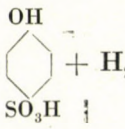
$$\text{Hämatoxylin} + 4KOH \longrightarrow K_4\,\text{Hämateinat} + 4H_2O$$

Hämateinate von zweiwertigen Metallen sind der Koagulation gegenüber schon empfänglicher, was vor allem durch den tieferen Grad ihrer Löslichkeit begründet

ist. Dasselbe bestätigt auch der Versuch, bei welchem mit Kaliumhydroxyd eine Dispersionserhöhung im Calciumhämateinat zu beobachten war. Aus der chemischen Dynamik ist bekannt, dass im heterogenen Elektrolytgemisch die Löslichkeit des einen Elektrolytes sinkt, wenn der Lösung in Gegenwart gleicher Anione ein anderer, sich besser lösenden Kation beigemengt wird. So scheint es bereits durch die Senkung der Löslichkeit erklärlich, dass durch Kalilauge das Calciumhämateinat zum grössten Teil ausgeschieden wird, als Anfangsgrad einer gröberen Dispersion. Auf den Zusatz von Kalilauge kann man bei der, die Kaliumhämateinate kennzeichnenden Farbenreaktion auch daraus schliessen, dass das besser lösliche Kaliumhämateinat entsteht, und so die Löslichkeit des Calciumhämateinates sich noch vermindert, was die Koagulierung zur Folge hat.

Mit Hämatoxylin bildet das Aluminiumsulfat einen Farbstoff molekularer Dispersion. Das Aluminiumhämateinat hat positive Ladung, wandert bei Elektrophorese zum positiven Pol und flockt sich dort aus. Alkalilaugen bewirken ebenfalls eine Koagulierung des Farbstoffes. Danach kann man annehmen, dass Aluminium sich mit drei phenolartigen Hydroxylen verbindet, während das vierte Hydroxyl frei bleibt. Die bei der Hydrolyse entstehende Schwefelsäure kann den Farbstoff in para (ortho)-Stellung sulfurieren. Die Entstehung des Isohämateinats ist gleichbedeutend mit dem Sulfurieren [6].

Die Reaktion könnte in drei Gleichungen geschildert werden :

1. $Al_2(SO_4)_3 + 6H_2O \longrightarrow 2Al(OH)_3 + 3H_2SO_4$
2. Hämatoxylin-$(OH)_4 + Al(OH)_3 \longrightarrow$ Al-Hämateinat-OH $+ 3H_2O$
3. Al-Hämateinat  $+ H_2SO_4 \longrightarrow$ Al-Hämateinat  $+ H_2O$

Die auf Einwirkung von Kaliumhydroxyd entstehende Koagulation ist so zu erklären, dass das Kaliumhydroxyd das frei gebliebene phenolartigem Hydroxyl neutralisiert. Das in dem Isohämateinat vorhandene dissoziable Hydrogen wird ebenfalls durch die Lauge neutralisiert.

Ferrichlorid hydrolisiert vollständig, es werden also aus jedem Molekül 3 Mol. Säure frei. Die geringe Koagulierung zur Zeit der Dialyse ist so zu erklären, dass die Diffusionsgeschwindigkeit des Hydrochlorids grösser ist, als die des Eisenhämateinate und dass es im neutralisierenden Medium koaguliert. Letzteres wird auch durch die Beobachtung bekräftigt, dass der Farbstoff durch Zusatz von Salzsäure besser dialysiert bzw. länger aufbewahrt werden kann. Aus Basen entstandene Hämateinate sind neutral, die positive Ladung des Eisenhämateinate dagegen ist an die Gegenwart von freiem phenolartigem Hydroxyl gebunden. Da Eisenhämateinat den Ultrafilter sehr schnell durch-

dringt, scheint es bestätigt zu sein, dass ein Molekül Eisenhydroxyd sich mit einem Mol. Hämatoxylin verbindet. Die bei der Hydrolyse entstehende Salzsäure drängt die Dissoziierung des frei bleibenden phenolartigen Hydorxyls zurück.

Die Konzentration des Kaliumchromats beeinflusst Farbe und Dispersion der entstehenden Farbe. Der Farbstoff hat positive Ladung, unterscheidet sich also auch qualitativ vom — aus Kaliumhydroxyd gewonnenen — Kaliumhämateinat. Die bei der Hydrolyse entstandene Chromsäure bildet vermutlich, ähnlich der Schwefelsäure, Isohämateinate. Zum frei bleibenden phenolartigen vierten Hydroxyl tritt in para(ortho)Stellung eine Chromsäure ein. Vermutlich verleiht das Chromat-Ion infolge seines dissoziablen Hydrogen-Ions der Verbindung eine positive Ladung. Im Farbstoff bildet das in der Hydrolyse entstehende Kaliumhydroxyd ein Phenolat mit drei phenolartigen Hydroxylen.

Die Bedeutung der Hämateinate in der Mikrotechnik

Zum Schluss kommen wir noch auf die Bedeutung der Hämateinate in der Mikrotechnik zu sprechen, indem wir die besonderen Eigenschaften der Färbungsmethoden zu erklären versuchen. Unserer Ansicht nach binden sich die Hämateinate nicht so sehr chemisch an die Bestandteile der Zellen, hauptsächlich an die Kerne, als eher auf dem Wege der Adsorption. Der Nukleus, Salze mit molekularer Dispersion und saurer chemischer Wirkung (Eisen Kalium-Hämateinat), häufen sich dort auf. Diese Ansicht wird durch die Tatsache bekräftigt, dass das Hämatein-Molekül von einem homozyklischen Viererring aufgebaut ist (KRUYT [7], BECHHOLD [1], STAUDINGER [9], MEYER und MARK [8]). BECHHOLD [1] z. B. erklärt die Hämatoxylin-Färbung des Zellkernes auf die Weise, dass die stark sauren Nukleoproteiden die Beize (z. B. kolloidales Aluminiumhydroxyd, Eisenhydroxyd, Eisenoxychlorid, Kalihydroxyd) adsorbieren und diese mit dem sauren Hämatoxylin eine Reaktion antritt. Diese Deutung wäre annehmbar, hat aber die Schwierigkeit, dass die fertigen Hämateinate, die «Beize» schon enthaltend (natürlich nur in Metall bzw. ihr Kation), neutral oder sauer sind. Die Hämateinate färben den Zellkern gut, ja sogar gewisse Strukturen des «basischen» Zytoplasmas. Wie wir übrigens gesehen haben, müssten sie, aus hydrolisierenden Salzen angefertigt, zwar eher das basische Zytoplasma als den sauren Kern färben, dies aber nicht tun. Die Farbstoffadsorption des amorphen Materials ist viel stärker als die der grossen Kristalle. Dagegen ist es auffallend, dass die Hämateinat-Adsorption von orientierten Mikrokristallstrukturen sehr gross sein kann, wie dies z. B. die Zellulosefaser oder der Seidenfaden zeigt. Daraus aber folgt, dass der Zellkern die Hämateinate deshalb besser adsorbiert als das Zytoplasma, weil er eine sehr feinkörnige oder eine Fadenstruktur besitzt. Das bedeutet, dass er

gegenüber dem Zytoplasma teilweise und im ganzen genommen über eine sehr grosse *Oberfläche* verfügt. Nun ist auch zu verstehen, warum die molekularen Farbstoffe sich zu Färbungen eignen : weil sie nämlich überall hineindringen und sich durch Adsorption genügend gut binden.

LITERATUR

1. Bechhold, H. (1919) Die Kolloide in Biologie und Medizin. Dresden : Steinkopf.
2. Fortner, H., Kalmus, H. (1928) Die quantitative Darstellung von Protisten und Bakterien mit Hilfe der Filtermethode nach Gimesi. *Z. Wiss. Mikr.*, **45**, 61—64.
3. Gimesi, N. (1923) Der Mikrofiltrierapparat von Gimesi. *Z. Hydr.*, **3**, 271—276.
4. Gimesi, N. (1924) A colloidszűrők elmélete. Die Theorie der kolloidalen Filter, Budapest : Ciszterci Rend Kiad. (Ungarisch, deutsche Zusammenfassung.)
5. Gimesi, N. (1924) Új, mikromembránás szívó-szűrőkészülék és alkalmazása a hydrobiologiában és technikában. Eine neue Mikrofiltrationspumpe und ihre Anwendung in der Hydrobiologie und Technik. Budapest : Ciszterci Rend Kiad. (Ungarisch, deutsche Zusammenfassung.)
6. Karrer, P. (1948) Lehrbuch der organischen Chemie. Zürich : Rascher.
7. Kruyt, H. R. (1929) Einführung in die physikalische Chemie und Kolloidchemie. Leipzig : Akademische Verlagsgesellschaft.
8. Meyer, K. H., Mark, H. (1950) Makromolekulare Chemie. Leipzig : Akademische Verlagsgesellschaft.
9. Staudinger, H. (1950) Organische Kolloidchemie. Braunschweig : Vieweg.
10. Wiesner, J. (1927) Die Rohstoffe des Pflanzenreichs. Leipzig : Engelmann.

КОЛЛОИДНАЯ ХИМИЯ ГЕМАТЕИНАТОВ И ИХ РОЛЬ В МИКРОТЕХНИКЕ

Н. И. ГИМЕШИ

Молекула гематоксилина содержит четыре гомоциклических кольца и на воздухе, легко окисляется, что вследствие образования хинона сопровождается цветной реакцией. При электрофорезе бесцветный гематоксилин перемещается к отрицательному полюсу и принимает характерную для гематеина красную окраску. Это явление обусловливается кислым (феноловым) характером гидроксильных групп. Гематоксилин, равно как и гематеин склонны к образованию солей. Однако, ввиду того, что только гематоксилин является бесцветным, хорошо растворимым в воде экстрактом, автор в своих исследованиях по образованию красителей и их дисперсности применял прежде всего гематоксилин. От опознавания свойств гематеинатов автор ожидал теоретическое объяснение часто применяемой в микротехнике методики окрашивания.

Автор применял в своих опытах гематоксилин в концентрации 1/1000 моль (0,358 г/л), содержащий 3 моля кристаллизационной воды. Он исследовал образование красителей из неорганических солей, из кислот и оснований, цвет красителей, направление их электрофоретического перемещения и степень дисперсности, как при помощи диализатора с коллодийным мешочком, так и работая с прибором для ультрафильтрации по Гимеши. Калибровку величин пор ультрафильтра автор проводил при помощи соединений (красителей) с известной величиной молекулы, что он с успехом использовал при относительных сравнениях.

Нормальные (нейтральные) хлористые, азотистые и сульфатные соли щелочных, щелочноземельных и земельных металлов не образуют красителей с гематоксилином.

Гидроокиси щелочных металлов давали светло фиолетово-красную окраску, и щелочи не вызывали коагуляции красителя даже в случае весьма большой концентрации. При помощи ультрафильтрации автор установил, что краситель имеет молекулярную величину. На основании электрофоретического исследования, краситель является нейтральным, то есть он не перемещается ни к положительному, ни к отрицательному полюсу. Полученные Визнером в вакууме гематеинаты щелочных металлов были бесцвет-

ными, что заставляет предполагать, что в молекуле красителя связывались четыре атома калия, так как краситель электрофоретически является нейтральным.

$$\text{Гематоксилин} + 4\ KOH \rightarrow K_4\ \text{гематеин} + 4H_2O$$

Гидроокиси щелочноземельных металлов дают синие красители, отчасти молекулярной, а отчасти коллоидной дисперсностью. Диализированный краситель при электрофорезе не перемещается. Под действием едких щелочей дисперсность красителя внезапно повышается. Это объясняется разницей растворимости гематеинатов щелочных и щелочноземельных металлов.

Среди гидролизирующих солей, автор занимался прежде всего с образованием красителей из сульфата алюминия, соли хлористого железа и хромата калия. Важным свойством является, что все три красителя перемещаются под действием электрического тока к отрицательному полюсу, то есть они имеют положительный заряд. На отрицательном полюсе краситель коагулирует при образовании осадка, точно так же, как в случае добавления едких щелочей. Эти красители имеют в общем молекулярную дисперсность, которую можно сохранять добавлением кислот (соляной кислоты, серной кислоты). Частичную коагуляцию в конце диализа (ультрафильтрация) можно объяснить тем, что скорость диффузии кислот больше скорости диффузии красителей. При объяснении этого явления необходимо учитывать довольно хорошую гидролизуемость применяемых солей, а с другой стороны, способность кислот (например, серной кислоты) образовать изогематеинаты (желтовато-красноватый краситель), (Визнер), что можно рассматривать как сульфонирование. В присутствии кислот можно при помощи ультрафильтрации, вне всяких сомнений, установить молекулярную дисперсность красителей, из чего можно заключить, что после образования хинона три из четырех оставшихся свободными феноловых гидроокисей связываются с данным катионом в форме гематеината, в то время как четвертая остается свободной и в пара или орто положении получается изогематеинат. Этим можно объяснить не только молекулярную дисперсность, но и положительный заряд, как и коагуляцию при электрофорезе.

В микротехнике применяются, главным образом, гематеинаты вышеприведенных трех хорошо гидролизирующих солей. Красители с положительным зарядом, подобно кислотам, весьма быстро проникают в клетки и адсорбируются структурно дифференцированными элементами. По мнению автора, в красителе, в первую очередь, играет роль адсорбция, и, пожалуй, только вторично-химическая связь. Адсорбционная способность красителей весьма значительна и согласно Бехольду, Круйту, Мейеру, Штаудингеру и т. д. можно между числом гомоциклических колец красителей и их адсорбцией выявить линейную связь. В аморфных структурных элементах адсорбция красителей гораздо сильнее, чем на поверхности настоящих кристаллов, но она больше всего проявляется на ориентированных пара (мета) кристаллических элементах с ультраструктурой (например, волокно целлюлозы, шелковая пряжа). Этим, пожалуй, объясняется, что гематеинатами алюминия и т. д. интенсивнее всего окрашиваются имеющие ультраструктуру ядро клетки, стенка клетки и т. д. Однако, пока еще остается невыясненным вопрос, почему гематеинаты и кислой реакцией (с положительным зарядом) окрашивают, в первую очередь, кислое ядро клетки, а не основную цитоплазму.

THE COLLOIDAL CHEMISTRY OF HEMATEINATES AND THEIR ROLE IN MICROTECHNICS

N. I. GIMESI

The hematoxylin molecule contains 4 homocyclic rings and oxydizes easily when exposed to the air, which, owing to the formation of a chinone structure, is accompanied by a colour reaction. By electrophoresis the colourless hematoxylin travels to the negative pole and assumes a red colour characteristic of the hematein. This phenomenon is accounted for by the acid (phenolic) character of hydroxyl-radicals. Both hematoxylin and hematein are liable to salt formation. Since, however, only the hematoxylin dissolves readily in water and is colourless, therefore in our investigations on colour formation and dispersity we dealt in the first place with the latter. We expected to arrive at the theoretical explanation of dyeing processes frequently applied in microtechnics by the ascertainment of the properties of hemateinates.

In our experiments the hematoxylin containing 3 mol mineral water was used in a 1/1000 mol (0,358 g/l) concentration. We investigated the dye formation of anorganic salts, acids and

bases, the colour of the dye, the direction of its electrophoretic travel and the degree of its dispersion by means of both the collodium dialysator-sack and the ultrafilter of Gimesi. The pore dimension of the ultrafilter has been calibrated with compounds (dyes) of known molecular size, and this procedure could be well used for relative comparisons.

The neutral chloride, nitrate and sulphate salts of alkaline-, alkaline earth- and earth-metals did not form dyes with hematoxylin.

The hydroxydes of alkaline metals gave a bright violet-red colour and even very strong potassium concentrations did not cause dye-coagulation. By means of the ultrafilter we were able to ascertain that the dye is of molecular size. The dye is electrophoretically neutral, hence it does not move either towards the positive or the negative pole. Wiesner's alkali-hemateins prepared in vacuum were colourless, and from this fact it may be concluded that since the dye is electrophoretically neutral, all four hydroxyls are bound by potassium in the dye molecule

$$\text{hematoxylin} + 4\,KOH \longrightarrow K_4 \text{ hematein} + 4H_2O$$

The hydroxydes of alkaline earth metals are blue coloured and form dyes of partly molecular and partly colloidal dispersion. The dyalised dye does not travel electrophoretically. Due to the effect of potassium hydroxyde the dispersion of the dye suddenly increases, which may be explained by the divergent solubility of alkaline and alkaline earth hemateins.

Among the hydrolysing salts we dealt first of all with the dye formation by aluminium sulphate, ferrichloride and potassium chromate. An important feature is that, due to the action of the electric current, the three dyes travel to the negative pole thus they have a positive charge. On the negative pole the dye coagulates leaving some precipitate, just as in the case of alkali hydroxydes. The dyes are generally of molecular dispersion, this can be preserved by the addition of acids (hydrochloric acid, sulphuric acid etc.). The partial coagulation of dyes at the completion of the dialysis (ultra filtering) can be explained by the fact that the diffusive rate of acids is higher than that of dyes. In order to explain the phenomenon we must take into consideration that, on the one hand, the salts employed hydrolyse extremely well, on the other, that acids (e. g. hydrochloric acid) might form isohemateinates (yellowish-reddish dye) (Wiesner), and this may be regarded as sulphonization. In the presence of acid the molecular dispersion of dyes might be indubitably ascertained by means of an ultra-filter ; from this fact it may be concluded that from the four phenolic hydroxyls that remain free after the formation of chinone, three are bound in the form of hemateinate by the cation under discussion, while he fourth remains free and isohemateinate is produced in the para or ortho position. Herewith may be explained both the molecular dispersion and the positive charge, as well as the coagulation occurring at electrophoresis.

In microtechnics chiefly the hemateinate of the above mentioned three well hydrolysing salts is used. The dyes with positive charge, similarly to acids, penetrate swiftly into the cells and become absorbed in the differentiated elements. In our opinion it is adsorption which plays primarily a role in the dye and only in the second place the chemical bond. The dye possesses extremely high adsorbing capacity since, according to Bechhold, Kruyt, Meyer, Staudinger etc., a direct correlation is demonstrable between the number of homocyclic rings of the dye and the adsorption of the latter. The adsorption of the dye is considerably higher in amorphous structure elements than on the surface of true crystals, but it is highest in the ultrastructural viz. directed para(meta) crystal elements (e. g. cellulose fibre, silk thread). This it may account for the fact that the ultrastructural cell nucleus, cell wall etc. are stained most intensely with aluminium, etc. hemateinates. For the time being, however, the question remains unsolved why it is not the basic cytoplasms, but the acid cell nucleus that the acid dye hemateinates in the first place.

BÉLA POZSÁR, Budapest, V., Szalay u. 10—14., VI/38

STUDIES ON THE EXTRACELLULAR DEVELOPMENTAL POSSIBILITIES OF MITOCHONDRIA IN THE CELLS OF PLANTS*

J. KARDOS and R. KIS BAGOLY

INSTITUTE OF PATHOLOGICAL ANATOMY OF THE MEDICAL UNIVERSITY, PÉCS (DIRECTOR: G. ROMHÁNYI)

(Received April 7, 1954)

Summary

Micro-cinematographic observations showed that the mitochondria in the internal epidermal cells of the onion bulb exhibited definite motility and that such spontaneously moving mitochondria were equally demonstrable in extracellular onion juice.

Culture tests revealed that microorganisms of the same type and exhibiting the same spontaneous movement grew from onion juice obtained under sterile conditions. Their relations to the onion cells could not be clarified.

The microorganism obtainable from *Datura stramonium* seeds was demonstrated to exert an atropinelike, acetylcholine-inhibiting action on the isolated frog heart, up to the fiftieth subculture of the strain.

On the basis of these experiments, close biological and biochemical correlations are assumable between the microorganism and the life processes of the plant cell.

Introduction

Growing attention is being devoted to the problem of the physiological significance of mitochondria, particularly since the isolation of cell fractions helped to reveal that mitochondria, in addition to being morphologically differentiated structural formations common to all living cells, represent biochemically organized fermentation units which catalyse oxydative phosphorylation processes and are of great importance in the various synthetic reactions connected with them [2].

Mitochondria are accordingly not only structural but also functional units within the cellular system. The increasing interest in them is not of a purely biochemical character but is also coming from quarters of general biology, for there arise a number of biologically essential questions, viz.: — (i) To what extent are those morphological and functional units of the cell system dependent for their lives on the cellular milieu? (ii) Are they capable of extracellular development as maintained by ENDERLEIN [12, p. 77], SCHANDERL [24, 25], SEYFARTH [21], WALLIN [27], and several other authors? (iii) Having once escaped from their cells, can they be incorporated into others again as is assumed

*On the basis of a paper read in 1952 at the first congress of Hungarian Microbiologists and in 1954 at a conference of the Hungarian Academy of Sciences, discussing living proteins

by LETTRÉ [9] in respect of the tumour-cell mitochondria labelled with P^{32}? The question as to whether extracellular development is or is not possible is closely connected with the fundamentally important biological problem of bacterial symbiosis. From their pertinent studies PEKLO [15], SEYFARTH [22], KOCH [7] and LEINER [11] concluded that in plants and certain animal species the decision whether the obligate intercellular microorganisms were symbiontic bacteria or mitochondria often proved very difficult, if not impossible, and depended on further research to be carried out with such methods as had more conclusive force than morphological or culture studies.

Experimental results

When, in 1948, we began to study mitochondria in plant cells, we first turned our attention to their intercellular behaviour. Basing ourselves on the results obtained from these morphological examinations, we thereafter proceeded to dealing with the specific activity displayed by microorganisms obtained from plants.

From the internal epidermis of onion bulbs small pieces, 0,5 cm^2 in size, were cut off and studied like hanging-drop preparations, with racked down condenser. It was found that in onion bulbs dug up a long time before the plasma in the cells of the inner epidermis contracted, detached itself from the cell membrane, and surrounded the nucleus in the form of a mass of granules (Fig. 1). On staining the preparation with Janus green diluted to 1 : 10 000 the granules became exceedingly conspicuous which proved that they were identical with the mitochondria and were not granules that had formed while the plasma was shrinking. On adding, dropwise, a hypotonic solution (sterile distilled water) to the cells of shrunken plasma the following observation could be made. *With plasmalysis starting, the aggregations of mitochondria broke up into smaller masses assuming the shapes of clusters or tetrads each of which, after some time, subdivided into still smaller groups yielding eventually forms of coccus, diplococcus, rod, and rods arranged in chain.* (This phenomenon bears resemblance to the process in which objects frozen in ice gradually reappear, during thawing, in their original shapes). (See Fig. 2.) The coccoid and diplococcoid mitochondria could easily be observed under the microscope, being rather conspicuous, even without any staining, in the plasma undergoing lysis. The rods and the rods in chains required closer inspection in order to be perceived since they usually were only to be found in a deeper layer of the plasma from which in colour they differed but by a shade. They are best studied under the phase-contrast microscope.

Observations showed that *the coccoid and diplococcoid forms began to exhibit motility before the currents in the plasma, started, and that their paths,*

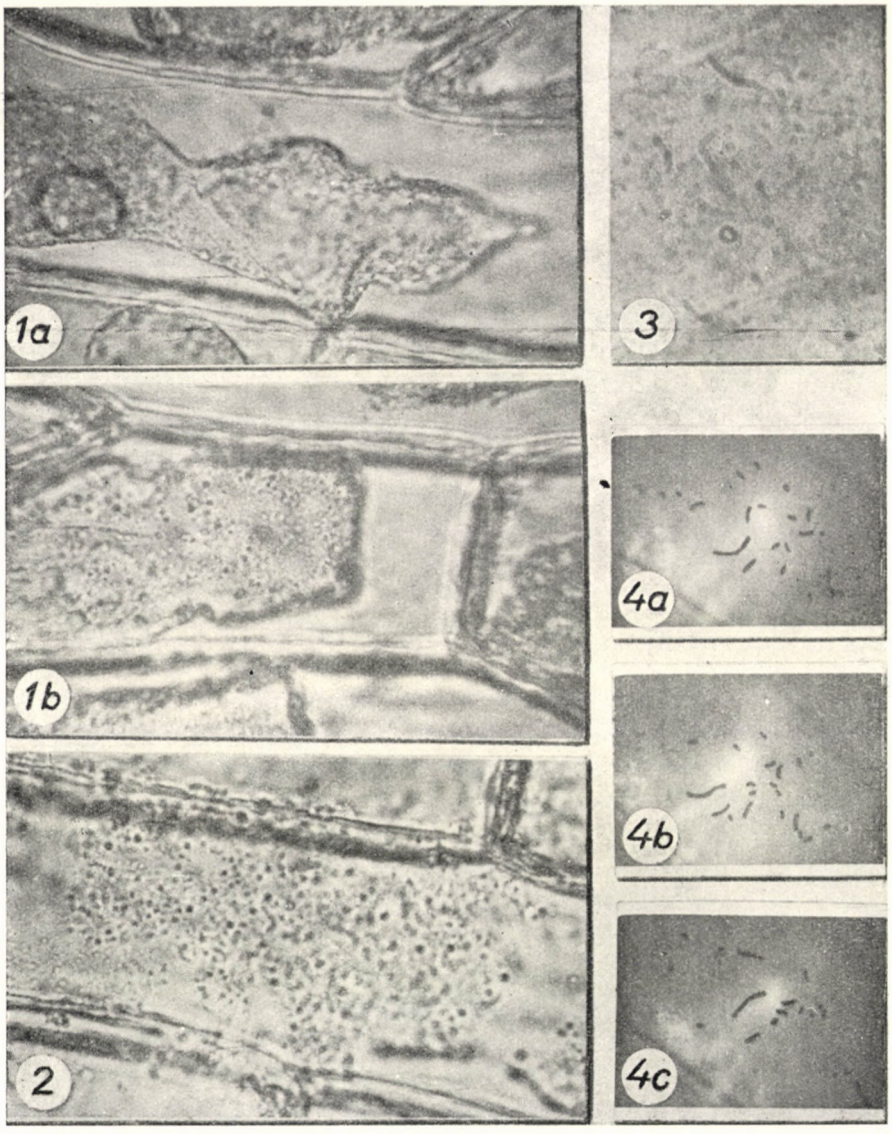


Fig. 1a. The shrunken plasma detaches itself from the cell membrane and, in shapeless form, settles around the nucleus. Unstained. x 800

Fig. 1b. Shrunken plasma of granular structure. Unstained. x 1000

Fig. 2. Mitochondria beginning to appear independently owing to plasmalysis. Unstained. x 1000

Fig. 3. Black lines show definite progressive movement of the coccoid mitochondria from one place to another. x 1000. Exposure 40″. Unstained

Fig. 4. Micro-cinematographic pictures of intercellular movement of rod-shaped mitochondria. The individual pictures were taken at intervals of about 0.4 seconds, during which time the mitochondria definitely changed their position. Unstained. x 1000

although short, were measurable, but of unpredictable direction. Fig. 3, made with an exposure of 40 seconds, appears to prove beyond any doubt that this movement was not the Brownian or molecular movement. The short route, on the other hand, speaks against a movement due to cytoplasmic currents.

The rods and rods in chain were equally observed to begin moving before the currents in the plasma started, yet their movement differed fundamentally from that of the coccoid forms. It is characteristic of their movement that *they advance by bending their body, face about, adhere with one end, and exhibit a groping mov ment* (Fig. 4).

Micro-cinematographic pictures were taken of this spontaneous, independent movement.

When studying the mitochondria of the epidermal cells of the onion bulb it was further found that mitochondrial movement was partly *active* and partly passive, the latter being due to the presence of currents in the plasma. Our own investigations of mitochondrial motility and the experimental findings of others — SZILVÁSI [23], BURCIK [1], ROBBINS [19] — proving that it was possible to culture microorganisms from plants, almost automatically brought up the question as to whether *the coccus and rod forms living in the cells and exhibiting motility might be microorganisms.* To decide this question, a series of inoculation tests were undertaken under sterile conditions. In order to destroy the microorganisms adhering to the surface, the onion bulb was kept for ten minutes in a 20 per cent antiformin solution and then soaked for three minutes in 90 per cent alcohol, which was later burned off. Thereafter the onion bulb was cut at a line two to three millimeters above the root zone, with a sterile blade. A whitecoloured milky juice was seen oozing from the cut surface. On inspecting this under sterile conditions with the hanging-drop technique under the microscope the same forms could be observed that had been noted within the cell. In other words, *the forms of coccus, diplococcus, and rod were present also in the juice* (Fig. 5). The presence of extracellular rod-shaped mitochondria in the juice of the onion bulb has likewise been observed by PERNER and PFEFFERKORN [16] (Fig. 7).

The juice, obtained with the above-described technique and containing great masses of mitochondria, was then inoculated into various culture fluids (3 per cent dextrose bouillon, 2 per cent glycerine bouillon) at pH 7.2. Following incubation for from 24 to 48 hours at 37° C. turbidity of the media in the tubes indicated *multiplication of a microorganism.* Thereupon the microorganisms grown in the fluid medium were streaked over a solid culture medium. On studying these streak cultures it was found that *the isolated colonies were of identical character. Ever so often repeated culture tests invariably yield a microorganism of the identical morphological properties.* Positive results were obtained in 90 to 95 per cent, provided a fluid medium was used for the first inoculation with onion juice.

The microorganism was found to grow in exceedingly mucous, non-haemolysing, grayish-white, bright colonies. Stained preparations of isolated colonies revealed, in 24 to 48 hour cultures, Gram negative microbes in forms of rod and rods in chain. In hanging drops these microbes were observed to be moving about actively and independently. Characteristic of their movement was that

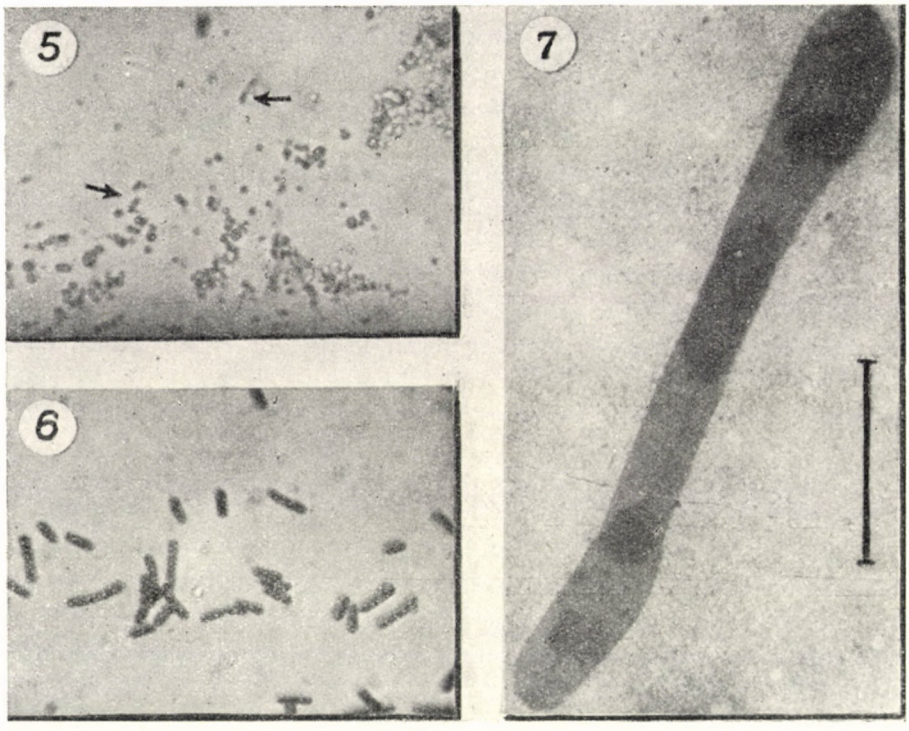


Fig. 5. Forms to be found in onion juice (coccus, rod). Unstained. x 1000
Fig. 6. Rod-shaped microorganism grown from the onion. Stained with Janus green. x 1000
Fig. 7. Electromicroscopic picture of rod-shaped mitochondrion in the juice of the onion bulb
From PERNER and PFEFFERKORN's communication

they advanced by bending their body, were capable of retracing their path without turning about and also of making 180° turns. They stained vitally with Janus green (Fig. 6).

To decide the origin of the microorganism obtainable from the onion juice (whether extra- or intercellular infection, symbiosis, or mitochondrion) is a matter accompanied by many difficulties, and culture tests will not suffice to clarify the problem convincingly. It was thought that it would be an indication

of a closer relation between the plant and the microorganism, if the latter were found to form some constituent part similar to a product of the plant used as starting material. Accordingly, the experiments were extended to test this speculation. For this purpose a plant with a highly characteristic constituent, which it was easy to demonstrate with a biological method, was judged to be most suitable. It was along these lines of thought that the final decision fell upon the seed of the Jimson weed *(Datura stramonium)* for the bacterial culture tests. The underlying concept was that *the bacterium possibly obtainable from it might reveal atropine or some other substance of atropinelike action.*

After being soaked for five minutes in a 20 per cent antiformin solution, the datura seeds were kept for three minutes in 90 per cent alcohol after which the alcohol was burned off their surface. Following this pre-treatment, the seeds were triturated under sterile conditions and from the triturate hanging drops prepared and stained with Janus green revealing forms of *coccus, diplococcus, rod, and rods in chain in them.*

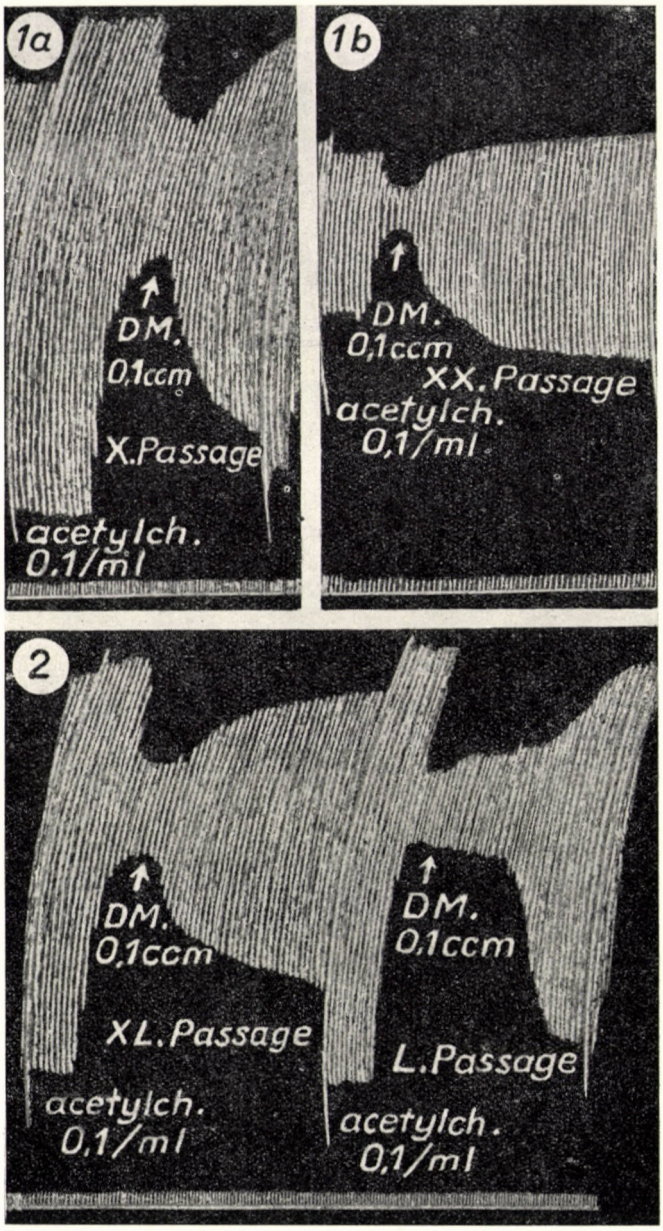
The sterile triturate of pH 7.2 was inoculated into a 4 per cent dextrose bouillon and incubated for 24 hours at 37° C. Diffuse turbidity in the tubes indicated multiplication of a microorganism. In the bacterial culture coccus and diplococcus forms were seen developing into rods and rods in chains, respectively, which in hanging drops exhibited intense motility. In cultures several days old there were only spore-shaped forms visible. The forms of the microorganism that had not yet formed spores were Gram negative and stained vitally with Janus green. In streaks on blood agar plates, colonies of an identical character were found. Isolated colonies turned grayish-white after 12, and greenish-brown after 24 hours. After cultivation for 96 hours the greenish-brown colour turned a brownish-black. The experiments were repeated several times, the *Datura stramonium* seeds invariably *yielding microorganisms of the above-described morphological properties.*

In the course of the experiments the following additional observations were made.

A slightly alkaline aqueous emulsion of datura was shaken with chloroform, the chloroformic part separated and the chloroform evaporated. What remained was the aethereal, oleaginous substance of an odour of menthol, known from the literature [28]. On repeating the experiment with the microorganism, the same oil of the odour of menthol could be demonstrated.

Examinations under the fluorescence microscope showed that the substance of the seed and the microorganism, or the substance produced by it, gave a greenish-blue fluorescence.

With a view to deciding whether the microorganism possessed any atropine-producing capacity the following experiment was carried out. A strain cultured for 24 to 48 hours on blood agar was scraped off and emulsified in 3 to 4 c. cm. of distilled water. Above a flame this was then heated to boiling, and thereafter



Diagrams 1 and 2: Acetylcholine-inhibiting action of bacterial filtrate, from the 10th, 20th, 40th, and 50th subcultures

centrifuged. DRAGENDORFF's reagent was added to 1 c. cm. of the solution so obtained, and this yielded a positive colour reaction. Tests to control this method of demonstrating alkaloid were invariably carried out with an aqueous extract of datura seeds, or with commercial atropine.

To some degree these tests suggested the presence of atropine-like substances, but to see clearly in the matter more reliable biological assays appeared to be necessary.

Cultures of 24 hours were scraped off the plates and emulsified in distilled water. Titrations with the solution so obtained were made on isolated frog heart prepared according to the method of STRAUB. *In the test frog heart stopped in diastole by acetylcholine the bacterial filtrate was found to re-start full action* (Diagram 1 and 2). (The consecutive titration experiments showed that it was comparatively difficult to have the substance washed out from the frog heart.) The next step was to exlude experimentally any supposition that the active principle derived from the seeds and possessing the acetylcholine-inhibiting effect demonstrated in the isolated frog heart, had really been transferred with the loop from the culture fluid inoculated with the substance obtained from the seed. To this end, fifty passages were made with an hypodermic needle from colonies isolated from agar plates, *and the fiftieth subculture was observed to have the same acetylcholine-inhibiting effect* as the microorganism derived from the first inoculation. On this basis, any supposition to the above effect seems to be definitely excluded.

Following our observations of the effect on the isolated frog heart, some additional experiments were carried out for control purposes. From pathogenic strains *(Prodigiosus, Staphylococcus mucosus, Staphylococcus haemolyticus, Pyocyaneous, Coli aerogenes,* and *Escherichia coli)* solutions were prepared with the above-described method and titrated in the same manner as the microorganism cultured from datura. None of these strains examined for control showed any acetylcholine-inhibiting effects.

The following procedure was adopted for the elimination of possible ionic action. A bacterial mass equal to that used for titration was ashed and thereafter titrated in an amount of water corresponding to that employed for titration. On titration no effect whatsoever was noticed.

The acetylcholine-esterase effect was excluded by the boiling process during the preparation of the solution.

These observations appear to render probable the assumption that the microorganism obtainable from datura seeds produces an atropinelike substance.

Discussion

Our observations on the mitochondria in the epidermal cell of the onion bulb confirm other authors' statements that in addition to their passive

movement due to the presence of currents in the cytoplasm, mitochondria are capable of spontaneous movement (LUNDEGARDH [3, p. 235], BORESCH [3, p. 235], SEYFARTH [22], SCHANDERL [25, 26]).

The fact that it is possible to grow microorganisms from seeds seems to speak very much in favour of the idea that what is confronting us here is not a primary infection originating from the soil, but perhaps a cyclosymbiosis of the cell and the microorganism that has developed in the course of generations. Support is lent to this conception by all the experimental results which prove that from sterile cultures of yeast cells and moulds bacterial forms develop spontaneously or are obtainable either by means of chemicals or by ultrasonic action. Our own experiments carried out on *Mucor racemosus* confirm these results. To-day, these «autolysate» phenomena are quite well known in the production of antibiotics (SCHANDERL [25], SEYFARTH [20, 21, 22], KELETI [6], JONAŠ [5]).

Bacteriologists generally take exception at observations of this kind, contending that the microorganisms obtained are due to infected air in the laboratory. Several facts observed appear to contradict this contention. *Thus, consecutive inoculations from different plants carried out in the same room yielded microorganisms of different morphological characters. Inoculations from the same plant species repeated several times in the same room invariably yielded the same species of microorganism.* The product having an «atropinelike» biological effect demonstrable up to the fiftieth subculture in the bacterial strain obtained from datura seeds, greatly contradicts any assertions of a mere secondary «infection» independent of the life functions of the plant. The observations made would rather be indicative of a close functional (biochemical) relation between the plant and the microorganism that can be grown from it. At present, there is no answer to the question in what manner the bacterial metabolic process, which as has been seen is accompanied by the production of an «atropinelike» substance, is linked up with the formation of a similarly active principle in the seed of the plant. Attempts to evaluate these correlations lead us onto a territory in biology where, apparently, we shall have to modify our present biological outlook in many respects, and remodel it according to the results of future research work.

There are numerous data in the literature concerning peculiar and often very surprising forms of specific intercellular symbiosis not only in plants but also in certain animals. Arthropoda if deprived of their symbionts are known to lose their capability of further development, their procreative power, and some of their specific fermentative activities (PEKLO [15], KOCH [7], PIERANTONI [17], PUCHTA [18]).

Our observations on datura seeds, fitting in with the concepts of specific symbiosis of plant and bacterium, show the great extent to which synergism of host and symbiont can develop. The same is shown by the observation of

other authors that in certain phases of his life the intercellular symbionts are from the outset indispensable to the host. Under these circumstances PEKLO's [15] question is certainly justified: «Microorganisms or Mitochondria?» But this question would be an obvious one even if the microorganisms we have to do with were exogenic and of specific symbiontic character, because they perform functions vital to the cells, just like the mitochondrial system of the cell itself. There are authors — ENDERLEIN [12, p. 77], JONAŠ [5], SCHANDERL [24, 26], SEYFARTH [20, 22] — who hold the view that *mitochondria are capable of extracellular development and can transform into microorganisms in the bacteriological sense of the word.* However, further studies are required before this point can be cleared up.

LETTRÉ's observations [9] also appear to show that the mitochondrion's life is not exclusively dependent on the cell. He inoculated mice that had an unlabelled tumour with mitochondria from radioactive P^{32} tumour cells. In from 3 to 5 hours it was found that the mitochondria had been selectively incorporated into the cells of the unlabelled tumours whence it was not possible to remove them even by washing with isotonic solution.

Recently, LEINER [10, 11] reported that rabbit serum immunized with *Pelomyxa palustris* homogenizate was found to agglutinate the symbiontic microorganism grown from *Pelomyxa.*

The literary data referred to in this paper and our own experimental findings would appear to show that there is intricate synergism possible between the organism of the symbiont and that of the host; further, that in some fundamental physiological and even genetical functional processes the major importance attaches to symbiontic action. Thus we are brought to face a problem which may be regarded as the fundamental problem of modern biology, namely that of the biological unit of cellular organisation, its subdivision into or regression to units of a lower order.

LITERATURE

1. BURCIK, E. (1949) Eine Kritik der Symbiosetheorie von H. SCHANDERL, auf Grund neuerer eigener Untersuchungen. *Arch. Mikrobiol.*, **14,** 309—333.

2. GREEN, D. E. (1952) Organized enzyme systems. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **39,** Suppl. 2, 75—112.

3. HERTWIG, G. (1929) Allgemeine mikroskopische Anatomie der lebenden Masse. In MÖLLENDORFF, W.: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. **I/1,** 1—420.

4. HURST, C. T., STRONG, J. C. (1932) Ueber die Kultivierung der Mitochondrien in vitro. *Arch. Protistenkde.*, **77,** 395—406.

5. JONAŠ, V. (1930) Neue Vermehrungsmethode von Kulturhefen und die Enstehung neuer Hefeformen. *Wschr. Brauerei,* **47,** 205—209.

6. KELETI, T., SZABOLCSI, G., LENDVAI, A., GARZÓ, T. (1954) Untersuchungen über die lebensfähigen Eiweisskörper (filtrierbare Form) von *Saccharomyces cerevisiae.* I. Die Regeneration im sterilen Filtrat von zerstörten Hefezellen. *Acta Physiol. Hung.*, **5,** 213—240.

7. KOCH, A., OFFHANS, K., SCHWARZ, ILSE, BAUDIER, J. (1951) Symbioseforschung und Medizin. *Naturwiss.*, **38,** 339—345.

8. LETTRE, H. (1952) Zur Rolle der Mitochondrien in Tumorzellen. *Naturwiss.*, **39** 267.
9. LETTRE, H. (1953) Über das Verhalten von Bestandteilen von Tumorzellen bei der Transplantation. *Naturwiss.*, **40,** 25—26.
10. LEINER, M., WOHLFEIL, MARIA (1953) *Pelomyxa palustris* GREEFF und ihre symbiontischen Bakterien. *Arch. Protistenkde.*, **98,** 227—286.
11. LEINER, M., WOHLFEIL, MARIA (1953) Das symbiotische Bakterium in *Pelomyxa palustris* GREEFF. II. *Naturwiss.*, **40,** 557.
12. LOVREKOVICH, I., TOMCSIK, J., LŐRINCZ, F. (1935) Bakteriológia, immunitástan, parazitológia. Bacteriology, immunology, parasitology. Magyar Orv. Könyvkiad. Társ., Budapest. (In Hungarian.)
13. MEINECKE, G. (1952) Veränderungen an Blutzellen in vitro. *Mikroskopie*, **7,** 89—96.
14. NELLO, M. (1949) *Krebsar t* **4,** 309.
15. PEKLO, J. (1953) Microorganisms or mitochondria? *Science*, **118,** 202—206.
16. PERNER, E. S., PFEFFERKORN, G. (1953) Pflanzliche Chondriosomen im Licht- und Elektronenmikroskop. *Flora*, **140,** 98—129.
17. PIERANTONI, U. (1951) Die physiologische Symbiose der Termiten mit Flagellaten und Bakterien. *Naturwiss.*, **38,** 346—348.
18. PUCHTA, O. (1954) Experimentelle Untersuchungen über die Symbiose der Kleiderlaus *Pediculus vestimenti* BURM. *Naturwiss.*, **41,** 71—72.
19. ROBBINS, W., HARVEY, ANETTE (1951) Contaminating bacteria in plant tumor tissue. *Science*, **114,** 322—323.
20. SEYFARTH, W. (1952) Über das Studium der Chondriosomen der Soorhefe *(Monilia albicans)* und ihr Nachweis mit Triphenyltetrazoliumchlorid. *Naturwiss.*, **39,** 162—163.
21. SEYFARTH, W. (1952) Über das Studium der Mitochondrien der Tumorzellen. *Naturwiss.*, **39,** 192.
22. SEYFARTH, W. (1953) Die Mitochondrien der Tumorzellen in ihrer Bedeutung als freibewegliche Körper und Wegebereiter der Metastasenbildung. *Naturwiss.*, **40,** 169—170.
23. SZILVÁSI, J. (1942) Untersuchungen über das Vorkommen von Mikroorganismen in den lebenden Geweben der Pflanzen. *Mitt. Bot. Inst. k. Ung. Univ. techn. wirtsch. Wiss. Sopr n*, [7], 6—21.
24. SCHANDERL, H. (1950) Über das Studium der Chondriosomen pflanzlicher Zellen intra vitam. *Züchter*, **20,** 65—76.
25. SCHANDERL, H. (1951) Über die natürliche und künstliche Verwandlung von Schimmelpilzen und Hefen in Bakterien. *Mikroskopie*, **6,** 146—157.
26. SCHANDERL, H. (1953) Die spontane und künstliche Verwandlung von Sprosspilzen (Hefen) in Spaltpilze (Bakterien). *Naturwiss.*, **40,** 296—297.
27. WALLIN, I. E. (1922) On the nature of mitochondria. III. The demonstration of mitochondria by bacteriological methods. IV. A comparative study of the morphogenesis of root-nodule bacteria and chloroplasts. *Amer. J. Anat.*, **30,** 451—471.
28. WEHMER, C. (1929) Die Pflanzenstoffe. II. Fischer, Jena.

ИССЛЕДОВАНИЯ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ВНЕКЛЕТОЧНОГО РАЗВИТИЯ МИТОХОНДРИЙ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

Я. КАРДОШ, Р. КИШ-БАГОЙ

В ходе изучения митохондрий растительных клеток авторы наблюдали и фиксировали микрокинематографическими съемками, что митохондрии клеток внутреннего эпидермиса лука проявляют оживленное активное движение, и что движущиеся митохондрии можно выявить также и во внеклеточном соке лука.

Опыты по культивированию выявили, что из стерильно взятого сока лука выделялись микроорганизмы одинакового типа, проявляющие подобные движения, однако, не удалось выяснить их связи с клетками лука.

В отношении микроорганизмов, разводимых из семени **Datura stramonium**, можно было на сердце лягушки выявить до 50 пассажа штамма атропиноподобное, тормозящее ацетилхолин действие. На основании полученных авторами результатов можно предполагать тесные биологические и биохимические связи между жизненными процессами микроорганизмов и растительных клеток.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE EXTRAZELLULÄRE ENTWICKLUNGSMÖGLICHKEITEN DER MITOCHONDRIEN DER PFLANZLICHEN ZELLE

J. KARDOS und R. KIS BAGOLY

Im Laufe der Untersuchung über die Mitochondrien der pflanzlichen Zelle wurde beobachtet und auch mikrokinematographisch festgehalten, dass die Mitochondrien der inneren Epidermiszellen der Zwiebel eine lebhafte aktive Bewegung ausführen und dass sich diese bewegenden Mitochondrien auch im extrazellulären Zwiebelsaft nachweisen lassen.

Züchtungsversuche ergaben, dass sich ein Mikroorganismus identischen Typs mit ähnlichen Bewegungserscheinungen aus dem steril behandelten Zwiebelsaft auszüchtete, doch konnten seine Beziehungen zu den Zwiebelzellen nicht geklärt werden.

An dem vom Samen von Datura stramonium gezüchteten Mikroorganismus lässt sich bis zur 50. Passage des Stammes eine azetylcholinhemmende, atropinartige Wirkung auf das Froschherz nachweisen.

Auf Grund dieser Untersuchungsergebnisse darf man eine enge biologische und biochemische Korrelation zwischen dem Mikroorganismus und dem Lebensprozess der pflanzlichen Zelle annehmen.

JÓZSEF KARDOS, Pécs, Kórbonctan, Hungary.

MICROSCOPIC INNERVATION OF THE CORNEA WITH REFERENCE TO THE NEURAL CONNECTIONS OF THE FIBROCYTES

A. ÁBRAHÁM

GENERAL ZOOLOGICAL AND BIOLOGICAL INSTITUTE, UNIVERSITY OF SZEGED (DIRECTOR : A. ÁBRAHÁM)

(Received : July 1, 1954)

Summary

The corneal innervation in fish, frogs, snakes, tortoises, birds and mammals has been studied with the use of BIELSCHOWSKY—GROS's and BIELSCHOWSKY—ÁBRAHÁM's methods of impregnation, and the following has been found.

1. Forming smaller and larger trunks and bundles, the nerve fibres pass from the ring-shaped scleral nerve plexus in a radial arrangement into the cornea at the corneo-scleral junction.

2. The stratified, radially and centrally running flattened nerve trunks give off an increasing number of branches, frequently exchange their fibres, and finally form plexuses which, closely interlaced, are arranged as superposed fibre-systems between the laminae of the *substantia propria*.

3. Having gradually emerged from the bundles and plexuses and given off in many cases vertical side branches, the non-medullated fibres change into conspicuously beaded — sometimes very tortuous — terminal fibres which form parallel — sometimes intersecting — patterns in frogs, snakes and tortoises.

4. The terminal fibres in the cornea of fish, amphibians and reptiles can be traced far in their course between the collagenous bundles and fibrocytes without observing any close connection between the fibres and the said bundles or fibrocytes. Sometimes, in amphibians and reptiles we find neural patterns which seem to show the intensively varicose terminal fibres to enter the corneal corpuscles ; pictures of this kind are, however, not quite convincing.

5. The fine terminal nerve fibres in the cornea of birds and mammals enter the fibrocytes, and travel on in the cytoplasm of the processes, to terminate freely here and there either in the perikaryon or in one of the processes. Terminations usually assume the shape of compact terminal beads the size of which is always superior to that of the varices along the fibres. The nerve terminals are sometimes joined to the axis-cylinder of the parent fibres by pedicel-like pieces of fibre.

6. Neural connections being as described, the fibrocytes, standing for interstitial cells, may be taken for stimulants with the function of transmitting to the nervous system the changes in pressure occasioned by processes of hydration or dehydration in the *substantia propria*.

7. We may regard the innervated fibrocytes as receptor organs called to regulate the cornea's lymphatic circulation — and thus nourishment and secretion — by raising or reducing blood pressure in the capillary loops.

8. Nerve fibres form particularly rich plexuses at the junction of the *substantia propria* and the anterior epithelium, and we find a fair number of closed networks of nerve fibres in such plexuses.

9. After entering the epithelium, nerve fibres pursue courses parallel to the surface in the lower layers, and form plexuses, even reticula, in the upper ones. Intraepithelial fibres emerging from or independent of the said mesh — or networks travel between the cells up to the uppermost layers where they form terminal beads between cells.

10. In the cornea of any of the mammals examined, I have been unable to detect sensory terminal organs such as were reported first by DOGIEL and later by EGOROW.

Introduction

Last year, apart from neurohistological studies of another kind, I was much concerned with the microscopic innervation of the various layers in the

eyes of vertebrata. Starting my investigations with the chorioid coat of birds I went on to examine the innervation of the sclerotic coat and the cornea. The eyes of birds had scarcely been subjected to examinations of this kind, and so it is only natural that I was able to find many new and surprising appearances in all layers. I was struck by what I found with respect to the relationship between corneal corpuscles and nervous system : it was ascertained beyond any doubt that there exists an intimate connection between the said corpuscles and the nerve fibres. A multitude of preparations has convinced me of the fact that the nerve fibres pass through the corneal corpuscles, string them up in the form of beads, and that, moreover, some of the fibres appear to end in the corpuscles by forming terminal knobs. This seemed to be something unusual, the like of which I had never seen in the course of my investigations into fibrocytes, neither had I come across literary contributions in this respect; these observations gave an entirely new aspect to my knowledge of and ideas about the innervation of the connective tissue, and threw a new light on the corneal corpuscles, their position and mainly their function. In order to ascertain whether one had to do here with a general rule governed by the physiology and phylogenesis of the eye, I examined the neural relations of the cornea taken from various groups of birds and all available vertebrata, with special regard to the corneal corpuscles and the intraepithelial nerve fibres. It is intended to give in the following an account of the results of these investigations.

Material and methods

As material, I have used the eyes of diverse vertebrated animals, from fish to mammals. The technique of the examinations was to remove the eye from the fresh carcass, to put it in a 10 per cent solution of neutral formalin and to leave it there for weeks, even months because we found that a prolonged immersion in formalin makes the material more suitable for neurological investigations. This done, the cornea was excised, or if it was a large one, cut into four to five pieces out of which frozen sections were prepared. Sections were mostly made tangentially as it was thus that we obtained the nerve trunks and nerve plexuses in the most satisfactory manner, and were able to observe the fibrocytes in the relatively largest area. The thickness of the sections varied between 20 and 40 μ ; with a view to trace also the finest ramifications of the nerve fibres, 5 μ sections too have been made. Most of these very thin sections impregnated quite as satisfactorily as the thicker ones. Though the tangential sections lent themselves very well to the solution of all neurological problems we prepared cross sections as well so as to be able to subject also the arrangement and path of the intraepithelial fibres to a close scrutiny : the thickness of such sections was from 5 to 10 μ. With one exception, we used the BIELSCHOWSKY—ÁBRAHÁM method [1, 2, 4] of impregnation ; provided the sections and the treatment had been flawless we obtained brilliant pictures with this method ; the pictures were so satisfactory that in their possession I venture to give due answers to nearly all problems arisen.

Pisces

Using the above mentioned method, we have examined the cornea from carps (*Cyprinus carpio* L.) and pikes (*Esox lucius* L.). As far as can be ascertained from the scanty literature at my disposal, as also from the findings of KRAUSE [11], the fish-cornea is relatively thick around the periphery, and becomes

gradually thinner towards the vertex. The main part of its substance is formed by the substantia propria corneae composed of parallel, laminated connective tissue. The fibrocytes, called also connective tissue corpuscles, or simply corneal corpuscles, lie between the laminae. The substantia propria, covered distally by the anterior corneal epithelium, is composed of 6 to 8 rows of cells in pikes ; the two outer rows are formed of extremely flat cells. The epithelium passes at the corneal limbus into the epithelium of the conjunctiva. Between the anterior epithelium and the substantia propria we find BOWMAN's membrane which, becoming gradually thinner towards the periphery, continues in the conjunctiva membrana basalis. DESCEMET's membrane is lacking. The substantia propria is bordered by a one-layered squamous epithelium towards the anterior chamber.

The cornea is abundantly supplied with nerve fibres. Arriving in smaller or larger bundles from the sclera to the corneal limbus, the fibres — still in bundles — travel in a radial arrangement towards the centre, and interlace there to form plexuses. While there are thinner and thicker fibres in the plexuses, all of them are smooth-edged and non-medullated. The bundles give off more and more branches in their distal course, and, reaching the junction between external epithelium and substantia propria, form a loose meshwork. As regards the relation of this plexus to the epithelium and the epithelial cells themselves, I shall revert to this question when dealing with the species of higher orders later in this paper. Large fibrocytes, that is corneal corpuscles, with anastomizing processes are clearly observable in the substantia propria. We can see a lesser or greater quantity of thin, sometimes strongly varicose, fibres running between them. The investigations made so far have not revealed any intimate connection to exist between the cells and the fibres in question (Fig. 1).

Amphibia

I have examined the corneal innervation in the bull-frog (*Rana ridibunda* LAUR.). The cornea is curved, its anterior epithelium is squamous and arranged in several layers. The lowermost layer of the epithelium is composed of cuboidal cells. This is followed by 1 to 3 layers of flattened cells. The substantia propria is somewhat thicker than the epithelium. BOWMAN's membrane is lacking. The substantia propria consists of 20 laminae running parallel to the corneal surface. The laminae are held together by a cementing substance. They are formed of bundles of connective tissue which too are bound by a cementing substance. The corneal corpuscles lie between the laminae, and polynuclear wandering cells may frequently be observed among them. Here, too, the fibrocytes have processes, although differing from those in fish. The fibrocytes are rather elongated, the number of processes less ; the latter are thick, shorter, have a

blunt ending, and seem to be shrunk in the preparations. Anastomizing cells can rarely be seen. Laminae and bundles are closely joining with one another, giving thus a homogeneous appearance to the entire substantia propria.

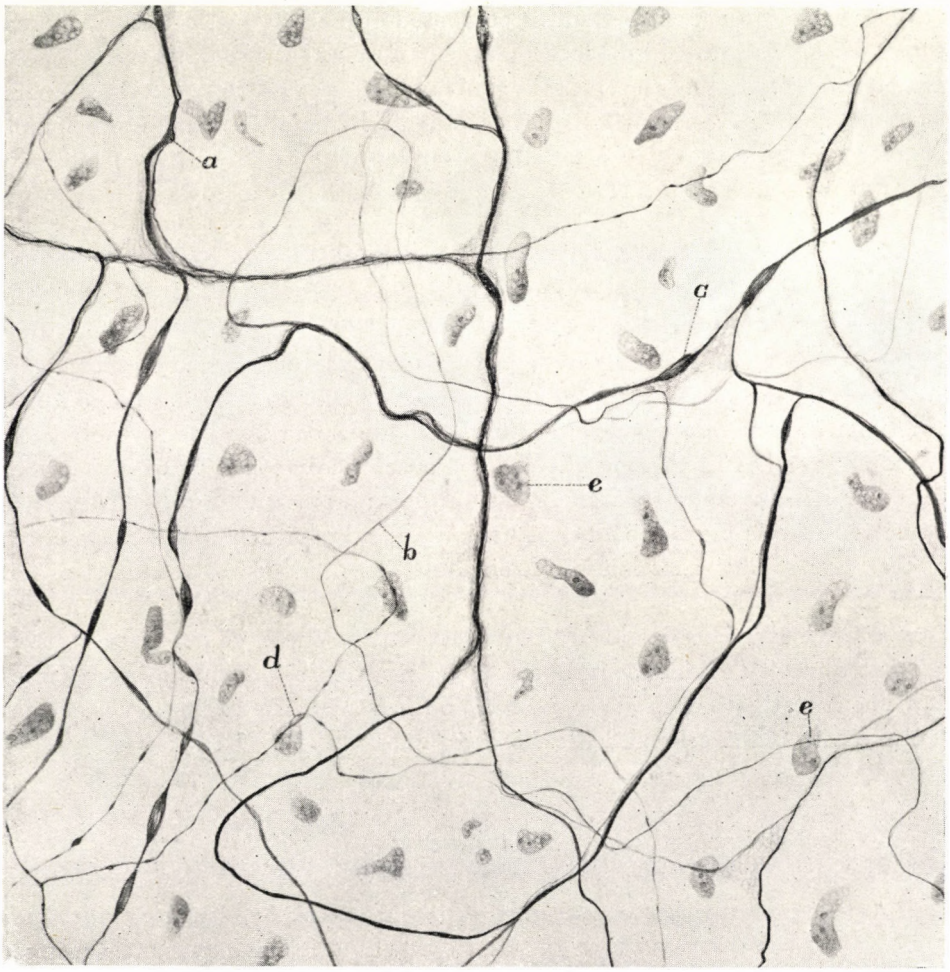


Fig. 1. Cyprinus carpio L.: corneal innervation. Nerve plexus in the substantia propria: *a)* thick fibre, *b)* thin fibre, *c)* neurofibril, *d)* varix, *e)* connective tissue nucleus. BIELSCHOWSKY-ÁBRAHÁM's method. Microscopic magnification 400 ×. Photographically reduced to 1/2

The substantia propria is followed by DESCEMET's membrane of 2 μ thickness: it consists of a homogeneous, finely fibrillated substance without any cells. The membrane is marked off towards the anterior chamber by a layer of squamous epithelium. The cells of the latter are quite flattened so that their diameter amounts to a fraction of a micron only. Most of the cells have the

shape of pentagonal or hexagonal plates and are held together by a blackish cementing substance.

Passing into the basal substance from the sclera the nerve fibres form a rich meshwork especially in the vicinity of the anterior epithelium. The fibres

Fig. 2. Rana ridibunda L.: corneal innervation. Nerve plexus in the substantia propria: *a)* nerve bundle, *b)* thick fibre, *c)* ramification, *d)* thin fibre, *e)* terminal fibre, *f)* connective tissue nucleus. BIELSCHOWSKY-ÁBRAHÁM's method. Microscopic magnification 100 ×. Photographically reduced to 1/2

of the plexus have different calibres: some are thick, and most of these are varicose, being fibrillated here and there. Dichotomizing repeatedly, the thick fibres change into fine terminal fibres; they sometimes form loops and are sometimes running on between the connective tissue cells in directions at right angle to their original course. The general neural pattern appears to be much

richer than that observed in the same layer of the corresponding organ in fishes (Fig. 2). We can see very fine branches to emerge from the bundles : they pursue courses parallel to the laminae, frequently form right angles, give off collateral branches here and there, and terminate as very fine and free end-fibres. Although

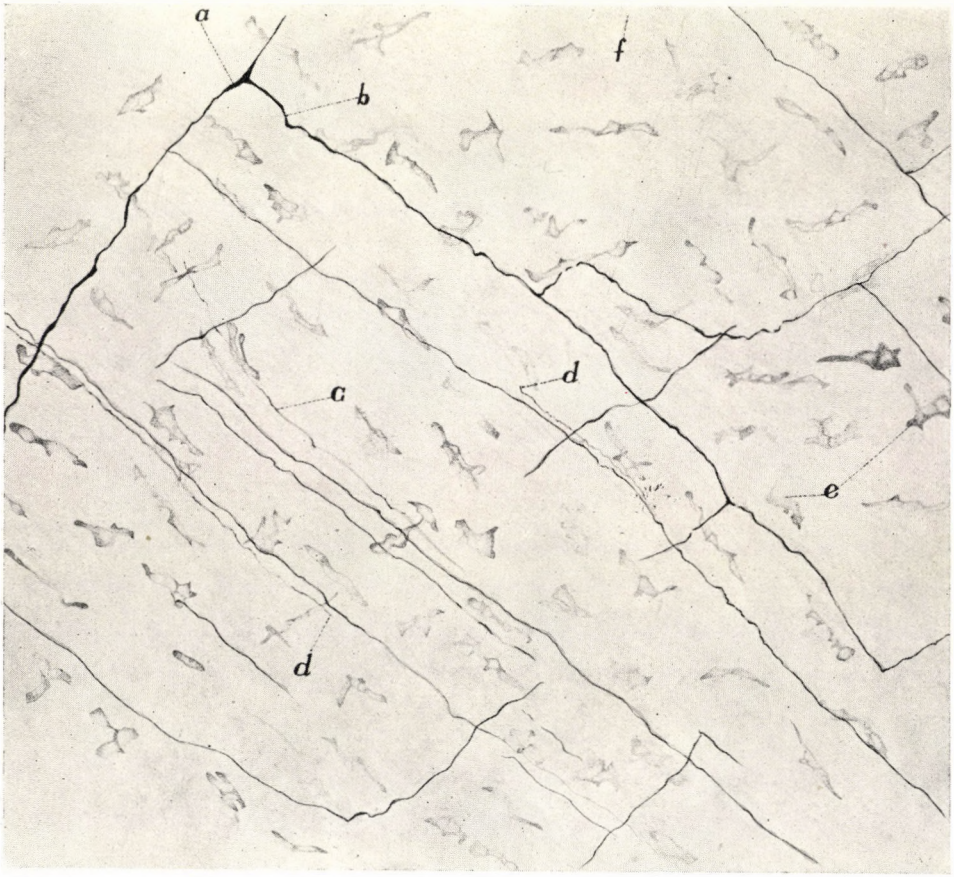


Fig. 3. Rana ridibunda L. : Corneal innervation. Nerve fibres in the substantia propria : *a)* thick fibre, *b)* branching, *c)* thin fibre, *d)* terminal fibre, *e)* corneal corpuscles, *f)* bundles of connective tissue. BIELSCHOWSKY—ÁBRAHÁM's method. Microscopic magnification 200 ×. Photographically reduced to 1/2

these terminal fibres are drawing quite near the corneal corpuscles in some instances, none of our preparations has yet revealed any close relation to exist between the two elements. The general neural picture allows of no definite conclusion as to whether the central lamellated layer and for its individual elements, the connective tissue fibres and the fibrocytes, are possessed of a separate, specific nervous supply (Fig. 3). Bearing in mind the conditions observed

in the species of higher orders the fibrocytes may be supposed to have their own neural connections also in the amphibians ; the preparations — which, as has been said above, are quite flawless — admit, however, of no definite

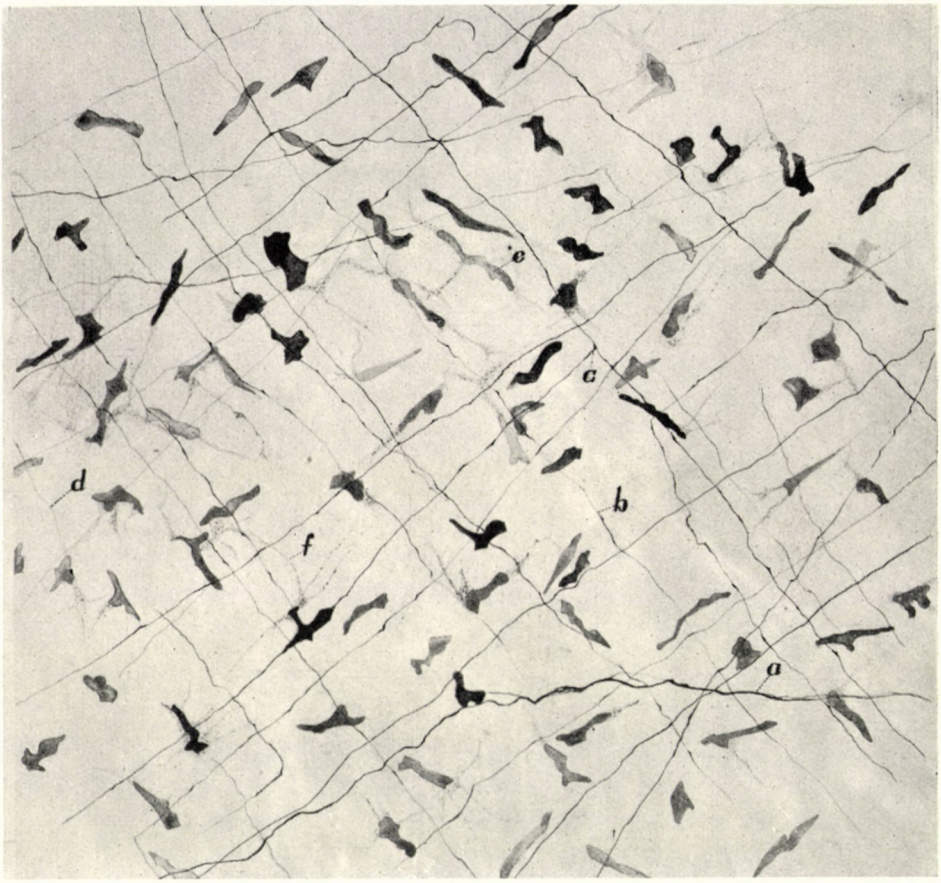


Fig. 4. Rana ridibunda L. : corneal innervation. Plexus of nerve fibres in the substantia propria : *a)* thick fibre, *b)* thin fibre, *c)* branching, *d)* terminal fibre, *e)* corneal corpuscle, *f)* process of connective tissue cell. BIELSCHOWSKY—ÁBRAHÁM's method. Microscopic magnification 200 ×. Photographically reduced to 1/2

conclusions in this respect. The mere fact to have found some of the fine nerve fibres passing above several of the fibrocytes would not justify to claim the existence of some sort of intimate connection between cells and fibres.

On the other hand, there are also histological pictures in which not only the processes of the fibrocytes are well visible but also anastomoses can be observed. Although the plexus of nerve fibres is much denser in such cases, their plexiform character remains unchanged notwithstanding the appearance

of peculiar, sporadic, wide-meshed netlike formations which a careful observation will invariably reveal to be composed of not anastomizing nerve fibres running beneath and above one another. Pictures of this kind, especially in view of the

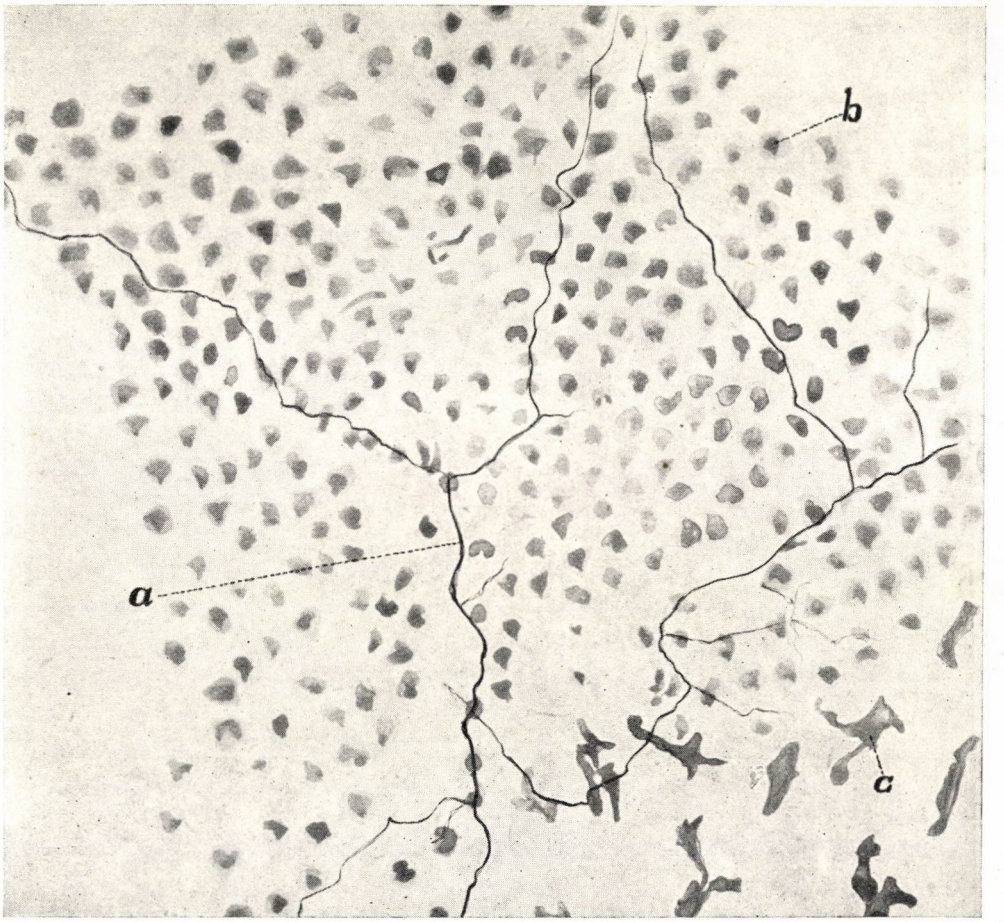


Fig. 5. Rana ridibunda L.: corneal innervation. Nerve fibres in the anterior epithelium: *a)* nerve fibre, *b)* epithelial cell, *c)* corneal corpuscle. BIELSCHOWSKY—ÁBRAHÁM's method. Microscopic magnification 200 ×. Photographically reduced to 3/4.

great number of nerve fibres, invite the assumption that here, too, there may exist a close relation between nerve fibres and fibrocytes, although we have not yet been able to demonstrate this connection (Fig. 4). Such theory seems to be supported by BOEKE—HERINGA (1923) and BOEKE (1935) who, working on frogs, found the nerve fibres to enter and terminate in the plasm of the corneal corpuscles. Our impregnation in this case was not complete, and this

fact may account for the divergence of the findings ; it is, on the other hand, also possible that BOEKE's intracellular endings were artefacts.

Though multiplying in the subepithelial connective tissue, the nerve fibres form only a loose meshwork from which extremely fine branches pass among the epithelial cells. Apart from them, we have also found fibres which run in the lowest epithelial layer, and may form, with the adjacent similar fibres, a plexiform arrangement (Fig. 5).

Reptilia

Of the reptiles, we have examined the cornea from grass-snakes (*Tropidonotus natrix* L.) and pond-tortoises (*Emys orbicularis* L.). The cornea of these animals, as of the reptiles in general, is strongly arched and becomes thicker towards the limbus. Its main component part is the substantia propria corneae which is disposed in laminae also in this case. A cementing substance serves to join the laminae and to form bundles of connective tissue fibres. While DESCEMET's membrane is not conspicuous at the vertex, its fine elastic fibres come to view on the periphery if stained with resorcin-fuchsin. The thickness of, i. e. the number of layers in, the anterior epithelium is variable : it is composed, as a rule, of two to three layers of cuboidal epithelial cells. The cornea is bounded by an exceedingly thin squamous epithelium towards the anterior chamber.

The general neural pattern resembles that of the amphibians. The nerve fibres are plexiformly arranged in the substantia propria, especially in the upper part thereof ; it is a wide-meshed, richly fibred plexus in which the fibres of varying thicknesses intersect each other. The thin nerve fibres spring from the trunks or the parent fibres at right angles : this phenomenon is even more characteristic in this case than in that of frogs. This break at right angles can be observed to repeat itself several times in the course of a single fibre. Nerve fibres are particularly thin in the cornea of the grass-snake : they form a fine plexus, and show many oval, sometimes hollow, varices in their course. Although there are many intersections, the plexiform fibres invariably retain their independence and never fuse with one another, not even in the terminal systems (Fig. 6).

We find a rather similar arrangement in the cornea of the tortoise, with the possible difference that the fibres are considerably thicker and more numerous ; this may be dependent on the thickness of the cornea. I have been unable to detect any intimate connection between corneal corpuscles and nerve fibres either in the grass-snake or in the pond-tortoise (Fig. 7). The shape of the corneal corpuscles seems to be better circumscribed than that in the amphibians ; processes are better observable and their anastomosis more pronounced than

in the amphibians but less complete than in birds. As a matter of fact, corneal innervation in frogs and reptiles shows a striking resemblance, while — at the same time — the fibrous pattern of the reptilian cornea is structurally similar

Fig. 6. Tropidonotus natrix L.: corneal innervation. Nerve plexus in the substantia propria: *a)* nerve fibre, *b)* branching, *c)* terminal fibre, *d)* corneal corpuscle, *e)* connective tissue nucleus, *f)* corneal lamina, *g)* bundle of connective tissue. BIELSCHOWSKY—ÁBRAHÁM's method. Microscopic magnification 200 ×. Photographically reduced to 1/2

also to that of the birds. Phylogenesis is positively reflected by the innervation: the neural picture of a cornea will decidedly reveal if the cornea was taken from an amphibian, a reptile, a bird, or a mammal; even related species can be distinguished. It should be added that differences due to a higher place in the scale of animal species are quite conspicuous only in the corneal innervation

of birds. In any case, whatever the connection between nervus oculomotorius, ganglion ciliare and nervus nasociliaris, the corneal fibres both in reptiles and Amphibia must be assumed to be exclusively sensory organs which may have a trophic, and possibly a tactile, function in the substantia propria, while

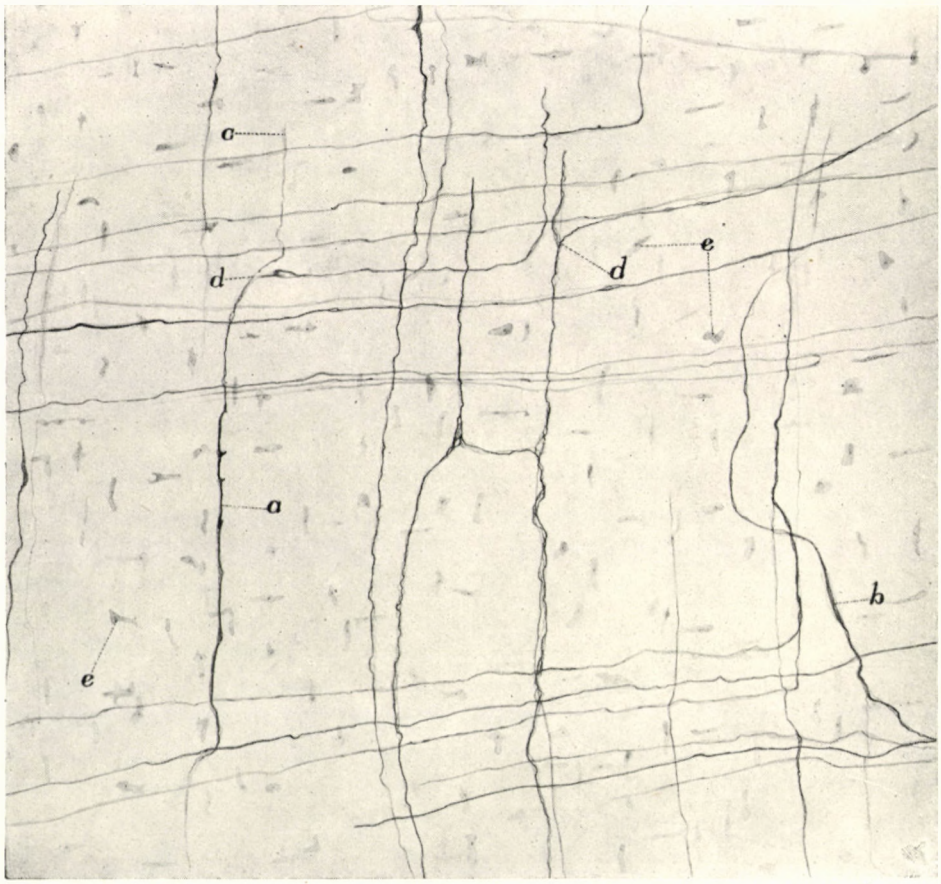


Fig. 7. Emys orbicularis L.: corneal innervation. Nerve plexus in the substantia propria: *a)* nerve fibre *b)* neurofibril, *c)* terminal fibre, *d)* branching, *e)* connective tissue nuclei. BIELSCHOWSKY—ÁBRAHÁM's method. Microscopic magnification 300 ×. Photographically reduced to 1/2

they positively serve to perceive pain in the anterior epithelium. Had we succeeded in finding a close relation between fibrocytes and nerve fibres, we should be justified to regard the fibrocytes as sensory — or receptor — organs destined to register the degree of pressure in the lymphatic system. However, in lack of a support given to such theory by microscopic observations, and in view of anatomical findings, we have to discard any such hypothesis. We should not

be surprised if subsequent investigations were to reveal new appearances in this connection, for — excellent as our method has proved to be in every respect — it is quite possible that, in its present form, our technique is not yet perfectly suited to reveal the finer neural ramifications in the cornea of the lower species of animals. I want to stress this point because we have been able to impregnate with our method very fine and complicated systems in birds and mammals the like of which could never be revealed in any other organ either by us or other investigators. It is, on the other hand, quite possible that there exist no such systems in the species ; of lower orders we must not forget that the conformation and the structure of the eye, the manner of life and the phylogenesis, are all closely interlinked factors which may have served to develop the finest structures and most intricate neural connections in the respective organs of the highest species only.

Aves

I have examined the cornea from hens (*Gallus domesticus* BRISS), turkeys (*Meleagris gallopavo* L.), guinea fowls (*Numida meleagris* L.), pigeons (*Columba livia domestica* OM), geese (*Anser domesticus* L.), black headed gulls (*Larus ridibundus* L.), buzzards (*Buteo buteo* L.) and spotted owls (*Syrnium aluco* L.). — Corresponding to the variously formed eyes as shaped in the course of time by the mode of life of the different birds, their corneas are widely differing both in size and shape. Arched as a rule, the cornea reveals considerable morphological divergences in the different groups as regards convexity, extent and thickness. These differences are, no doubt, rooted in the manner of life as also in ecological conditions. While in some birds the cornea hardly stands out of the bulb's contours, it is highly convex in others. Then again, the protrusion of the cornea is connected with a partial lengthening of the sclera, as is the case in the well known telescope eye of the owls, whereas, in other birds, the sclera forms no part of the convexity. There are many transitory forms between these types. The size of the cornea depends on whether the edge of the bulb (*sulcus sclerae*, in man) is preceded by a part of the sclera, or if the cornea begins immediately at that edge. Irrespective of whether there is a broad sclerotic part on the anterior surface of the bulb or not, differences can be seen according to whether the cornea emerges in a highly convex or a flattened form. This may depend on the size of the lens since highly convex eyes have always large lenses, the lenses themselves being also highly convex, whereas flattened corneas are accompanied by smaller and much flatter lenses. The cornea of birds has a diameter of 5 to 6 mm ; it is thinnest at the vertex and thickest at the limbus. It is, like the cornea of all vertebrates, composed of anterior epithelium, *substantia propria*, DECEMET's membrane and posterior epithelium. The anterior epithelium consists of 4 to 5 squamous epithelial layers. The upper part of the lowest layer

is cuboidal, and this is followed by a layer of columnar cells, the cells in the other layers being flattened. Leaving the sclera, the epithelium passes into the stratified columnar epithelium of the *conjunctiva*. The bulkiest part of the cornea is the *substantia propria* which is composed also in this case of laminated connective tissue running parallel with the surface. Besides collagenous fibres there are also elastic fibres in the laminae, the latter being however confined to the corneo-scleral junction. Between the laminae we find corneal corpuscles of great extent, provided with processes : fusing with one another the latter form a protoplasmatic network which pervades the whole membrane. DESCEMETS's membrane is very thin and stains with resorcin-fuchsin. The posterior epithelium has one layer only, with flattened cells, which reach into the anterior chamber.

The nerve fibres of the cornea rise from the *nervi ciliares breves* and the *nervi ciliares longi*, and all of them pass from the sclera into the *substantia propria*. As regards their origin, a part of them is composed of the axons of the unipolar cells of the *ganglion ciliare*, while another part are sensory fibres of the *nervus trigeminus*, which fibres, after avoiding the *ganglion ciliare*, get into the path of the postganglionic fibres as *nervi ciliares longi*. Since our knowledge of the structure and function of the cornea leaves no doubt that it contains nothing but sensory fibres, one might be justified — until the pertinent experimental investigations will have taken place — to regard all corneal nerve fibres to be of trigeminal origin and to belong to the terminal fibre-system of the *ramus nasociliaris*. It is often asserted, and also quite well possible, that there are, or may be, sensory fibres among the sympathetic, or in the present case rather parasympathetic, fibres the cells of which are disposed between the motor or secretory cells one by one or in groups. Provided this hypothesis is correct, these fibres, being postganglionic parasympathetic fibres, perform a sensory function in all corneal layers.

The nerve fibres, crossing over from the sclera, reach the *substantia propria* elliptically at the corneal limbus. They form smaller and larger trunks in the *substantia propria* and these trunks give off branches in their course ; the nerve bundles so formed cross each other's path, and — as a result — present the appearance of genuine reticula the very structure of which seems to «short circuit» nervous stimuli. And yet, these are no reticula in reality : a careful observation will always show that the fibres, much as they seem to form reticula, invariably pass beneath and above one another without ever anastomizing, so that no continuous reticula can be formed. We found no difficulty in impregnating this generally very rich system. BIELSCHOWSKY—ÁBRAHÁM's method [1, 2, 4] reveals the nerve fibres in the corneas of a great diversity of birds satisfactorily and selectively especially if the material had been fixed in formalin for a sufficient length of time, and if both formalin and ammonia were in perfect condition. However, it is only fair to record that it has not always been possible

to demonstrate the finer structures, precisely those the demonstration of which gave me the impetus to make a systematic investigation into the corneal innervation ; I have found that even where it was possible to obtain the desired pictures, their quality differed according to the particular bird examined. I want this to be understood, as many a bird-cornea has been impregnated by us without being able to trace any intimate connection between corneal corpuscles and nervous system. There were nevertheless quite a number among the many preparations which — when placed under the microscope — revealed neural pictures such as none of our investigations had revealed to us in this field, and which seemed to be unusual from the point of neurology, pictures that inspired us to a still more thorough study of the problem and to investigations into the real conditions with the aid of comparative material.

Corneal corpuscles with many processes were as a rule well observable in pictures of this kind ; we could also see that most of these elements formed anastomoses with similar adjacent elements. Smaller and larger nerve bundles were also clearly traceable : they were seen to give off single fine branches which, while ramifying now and then, were running on in the connective tissue in most cases, forming sometimes almost regular squares in that tissue. The fibres of these nerve bundles were definitely seen to pass through the plasm, and sometimes through the very nuclei of the connective tissue cells, whereas — in other cases — they were observed to surround the cells almost completely. Pictures of this kind are really unusual and may, when first seen, set neurohistologists thinking ; any doubts are, however, soon suppressed, since the impregnation in most of our preparations is perfect to such a degree that there remains no place for any doubt as to the exceedingly fine and peculiarly coursing fibres being genuine nerves and nothing else (Fig. 8). I feel justified in making this statement because, in flawlessly impregnated preparations, the nerve fibres which appear as beaded neurofibrils and become pitchblack when stained with gold, can precisely be distinguished from the thicker, paler, alveolarly structured and well traceable fibrocyte-processes.

The abundance of the nervous supply, and especially the presence of fine varicose fibres is sometimes quite astonishing. Pictures of low magnification reveal fibres in such numbers that — but for the technically perfect separation of anastomoses and nerve fibres — one should feel inclined to regard the latter as anastomoses, i. e. simple threads of cellular processes running parallel to the collageneous fibres of the accidentally impregnated laminae. Seeing such pictures for the first time one is assailed by doubts which soon cease in view of the aforementioned complete and convincing separation between connective tissue and neural elements. Even after having convinced oneself in this respect one is inclined at first sight to take pictures of even as low magnifications as 200 $\times$ to represent fibres with the apparent tendency to form networks. However, a more careful observation of these pictures of low magnification will reveal

beyond any doubt such vast numbers of very fine, beaded nerve fibres travelling along the axes of the collagenous laminae that the whole picture seems to be

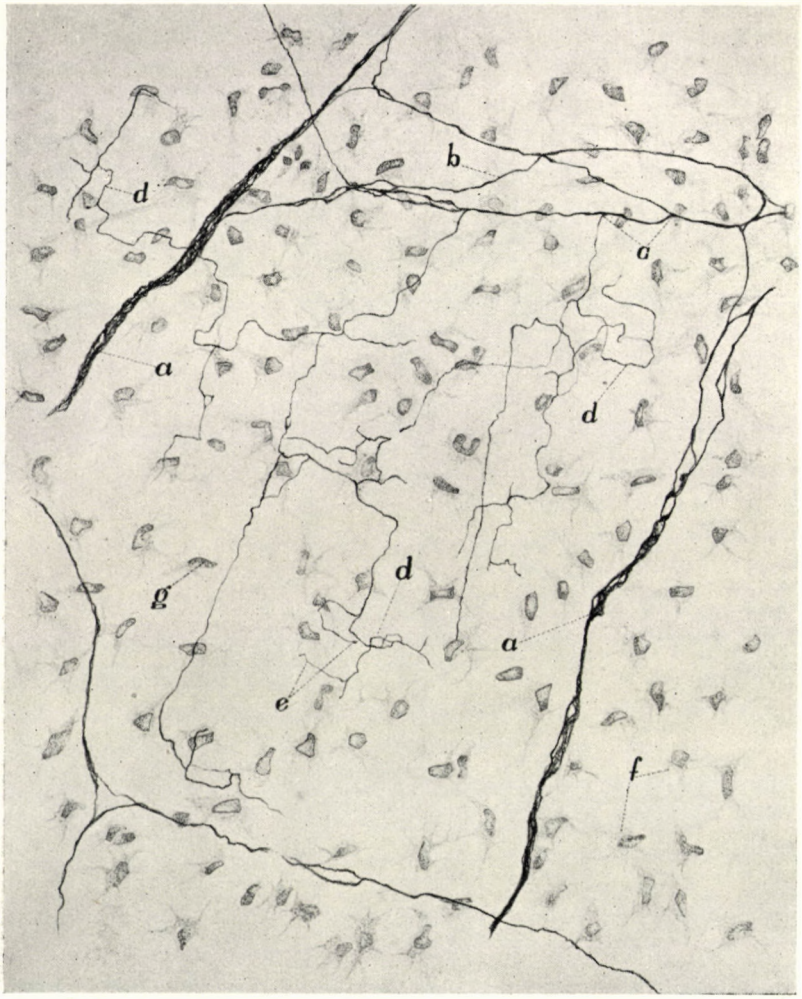


Fig. 8. Gallus domesticus BRISS : corneal innervation. Nerve plexus in the substantia propria : *a)* nerve bundle, *b)* nerve fibre, *c)* branching, *d)* intercellular plexus, *e)* nerve terminal, *f)* corneal corpuscle, *g)* connective tissue nucleus. BIELSCHOWSKY—ÁBRAHÁM's method. Microscopic magnification 200 ×. Photographically reduced to 1/2

almost inconceivable and hardly credible. Sporadical, fine branches leave the fibres : they almost invariably spring at right angles from the parent bundle. We have mentioned a similar pattern in the amphibians and reptiles. Although the whole system of these fine fibres is actually arranged in a netlike mesh-

work, there can be no doubt as to its being a plexus; this is clearly demonstrated in the drawing illustrating the cornea of a goose (Fig. 9.).

Pictures of a higher magnification are even more convincing, for the course of the fibres can be well traced in highly magnified sections. Such pictures invariably reduce the apparent reticula to plexuses which pervade the *substantia*

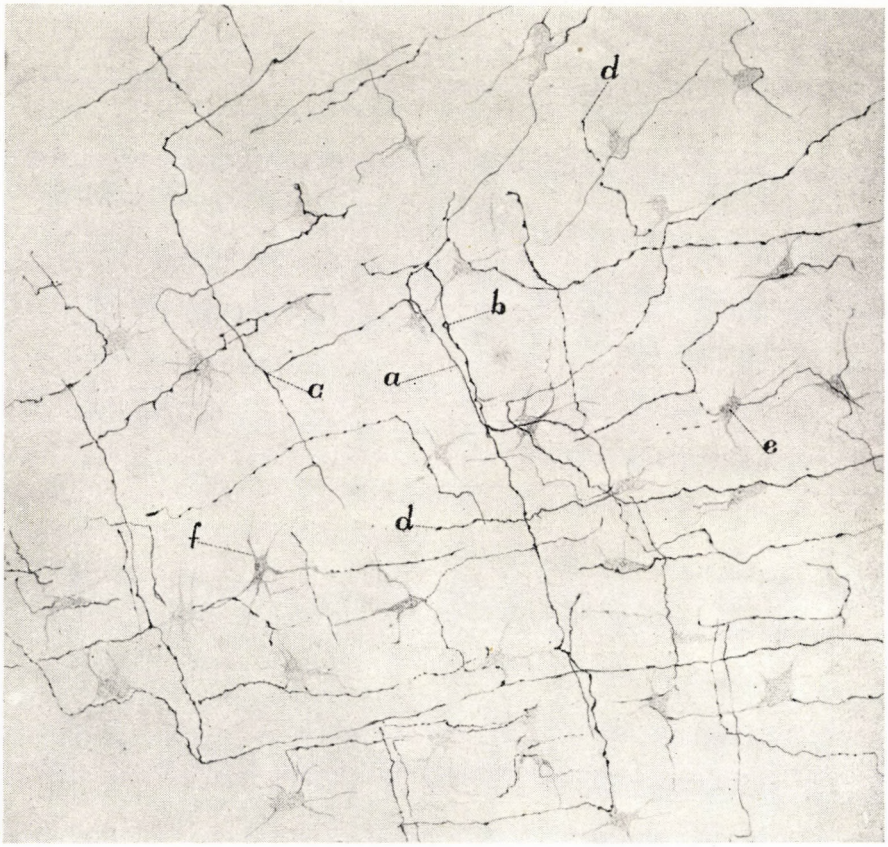


Fig. 9. Anser domesticus L.: corneal innervation. Nerve plexus in the substantia propria: *a)* nerve fibre, *b)* varix, *c)* branching, *d)* termination, *e)* connetive tissue corpuscle, *f)* cellular process. BIELSCHOWSKY—ÁBRAHÁM's method. Microscopic magnifiaction 200 ×. Photographically reduced to 1/2

propria in great abundance and closely attach themselves to the corneal corpuscles by means of terminal fibres. This attachment may be of many kinds. In the majority of the cases, the nerve fibre simply enters, and sometimes passes through the plasm of the corneal corpuscle, whereas, in other cases, it links up two or more cells along an anastomosis. However, it may be, one thing is sure, and this is that there exists a very close relation between corneal corpuscles

and nerve fibres. The unravelling of this intimate connection is, of course, far from being easy. One is never sure if the fibre travels on the cellular surface or in some groove on the cell, or else, actually passes through the protoplasm and, at that, not only through the perikaryon but also through the anastomoses by which the cells are fused. The solution of the problem is difficult from one point of view and simple from another. It is difficult, for — as has been said — it is always uncertain whether the fibre under examination is travelling in the cellular plasm or on the cell's surface only. It is also possible — a theory advocated by several authors past and present — that there exists a shallow or deep groove on the surface of the cells and of the anastomizing processes ; this groove would be sharply delimited inwards, i. e. toward the protoplasm. If this theory is correct, we have really a case of a mere superficial contact before us, governed by the physiological principle of the parallel-contact. — The problem in question is, on the other hand, easy to solve as our sole clue is given by the adjustment of the microscope. If at a given adjustment we can well observe the nucleus and, at the same time, clearly see the nerve fibre in the protoplasm, we are justified to affirm that the nerve fibre is actually in the protoplasm of the cells, especially in the present case where the nuclei are centrally arranged as a rule. On this basis, it must be accepted as a fact that — as far as the cornea of birds, geese and hens in particular, is concerned (these were our best preparations) — the nerve fibres are actually in the cytoplasm of the corneal corpuscles (Fig. 10). The possibility of the existence of the above mentioned preformed grooves — the depth of which comes near the nucleus — can, of course, not be excluded in this case either.

It has already been mentioned that also the differences in staining prove the aforementioned fibres to be nerve fibres. In order to remove any possible doubt that may nevertheless arise in this respect I was at pains to select neural pictures in which the connection of the fine fibres with the parent nerve trunks, i. e. their projecting from them, was perfectly observable. I have found quite a number of such pictures, and they have absolutely confirmed that the thin fibres traverse the cellular processes, and pass also through the cells crosswise and lengthwise, sometimes in the immediate vicinity of the nucleus. It was further revealed that, bending over from the plasm of a cell, the fibres enter the plasm of the next cell, then again that of the next, and so forth (Fig. 11). Smaller or larger nodules were seen along the path of the fibres : we found most of them to lie within the area occupied by the cell-protoplasm or the main process. The nodules in question may be nerve terminals. Such conception too may be erroneous since their number is limited and because one can never tell for sure whether they really represent nerve-endings or just varices. Anyway the probability of the nodules being terminals is neither more nor less than that of their being varices. This question has been the subject of heated conten-

tions for a long time. KÜHNE (1862) found the nerve fibres to terminate in the protoplasm of the fibrocytes. While WALDEYER and IZQUIERDO (1880), LIPMAN (1869) and KÖNIGSTEIN (1875, 1877), agreed with KÜHNE's findings,

Fig. 10. Anser domesticus L.: corneal innervation. Nerve fibres in the corneal corpuscles: *a)* nerve fibre, *b)* branching, *c)* nerve fibre in the cytoplasm, *d)* nerve terminal, *e)* corneal corpuscle, *f)* cellular process. BIELSCHOWSKY—ÁBRAHÁM's method. Microscopic magnification 400 × Photographically reduced to 1/2

other investigators were of a different opinion, e. g. ENGELMANN, KOELLIKER (1848, 1866), PETERMOELLER (1869), HOYER, RANVIER, DOGIEL, VIRCHOW and ATTIAS [6] who disclaimed any such intimate connection between corneal corpuscles and nerve fibres. In a paper, published in 1910, VIRCHOW decidedly declares that nerve fibres do not terminate in the protoplasm of fibrocytes.

Of the more recent investigators, BOEKE—HERINGA, (1923) and BOEKE (1935), having worked on the the cornea of frogs, affirmed that the nerve fibres enter,

Fig. 11. Gallus domesticus L.: corneal innervation. Nerve fibres in the corneal corpuscles: *a)* bundle of nerve fibres, *b)* nerve fibres, *c)* terminal fibre, *d)* nerve terminal, *e)* corneal corpuscle, *f)* cellular process. BIELSCHOWSKY—ÁBRAHÁM's method. Microscopic magnification 600 ×. Photographically reduced to 1/2

and terminate in, the protoplasm of fibrocytes. Referring to mammals, REISER (1936—37) found that the nerve fibres pass into the cytoplasm of corneal corpuscles and are forming terminal reticula in them. Again, NAGEOTTE—GUYON (1926) and also MARTINEZ (1940) denied the intraprotoplasmatic ending

of nerve fibres. Moreover, MARTINEZ denies altogether that the nerve fibres of the *substantia propria* have free endings. He thinks that, without having free terminations, the terminal branches of the fibres pass into one another and form an extracellular network. ZANDER and WEDDEL [13] who studied the nerve fibres in the cornea from sharks, frogs, guinea-pigs, monkeys and man with methylene blue stain, impregnation as also under phase-contrast conditions, suggest that «the findings of BOEKE and REISER are artefacts resulting from shrinkage during the course of preparation of the tissue for microscopical examination as well as non-specific impregnation methods». They hold the view that the nerve fibres of the *substantia propria* terminate on the surface of fibrocytes or, in some cases, on that of histiocytes which latter — though few in number — can be found in the cornea. ZANDER and WEDDEL refuse to postulate any close relation between fibrocytes and nerve fibres. They suggest that the fine fibrils springing from the terminal plexuses of the *substantia propria* end freely, in the form of clearly observable terminal beads which are usually preceded by a string of similar beads. Recently, JABONERO and LORENTE [10], having worked on human eyes, took a firm stand in favour of the theory of intraprotoplasmatic termination. Their drawings seem to be conclusive, although we still cannot discard the possibility of the existence of grooves or plasma-depressions.

Microscopic pictures of a higher magnification furnish a specially strong proof for the close connection of fibrocytes and nerve fibres in the cornea of birds. The course of the fibres is clearly traceable in these pictures, and even the entire system of a single fibre can often be observed (Fig. 12). It is quite clear from the figure that, after successive and repeated multiplications, the fibres end in rich terminal plexuses which involve nearly all fibrocytes within their area. Some parts of the branch system are strongly varicose : they are drawing so close to the cell plasms and the processes that the resulting pattern forces us to suppose them to be actually in the protoplasm or, else, to postulate a close contact between them if only on the surface of the protoplasm. This applies still more to the very fine, likewise varicose, fibrils which disappear here and there as rounded-off terminal ramifications in the plasm of the fibrocytes. We can also observe in the drawing smaller or larger nodulous or triangular swellings both at the points of division and elsewhere. They are sometimes entirely in the cell bodies, and definitely appear to be real terminations.

Still higher magnifications and extremely careful observations reveal genuine nerve terminals actually seated in the plasm of the corneal corpuscles. Essentially, these endings are terminal beads the like of which are well known from the sites of sensory nerve terminals, especially from the epithelia. Their structure is closely knit ; although no fibrillation can be seen in them they have the characteristic appearance of terminations. True, we have also seen intraprotoplasmatic endings structurally similar to those described above

Fig. 12. Gallus domesticus L.: corneal innervation. Terminal plexus system of a single nerve fibre in the substantia propria: *a)* nerve fibre emerging from trunk, *b)* ramification, *c)* branching, *d)* terminal fibre, *e)* nerve fibre in the corneal corpuscle, *f)* corneal corpuscle, *g)* connective tissue nucleus. BIELSCHOWSKY—ÁBRAHÁM's method. Microscopic magnification 1200 ×. Photographically reduced to 1/2

in which a careful micrometric observation revealed a fine fibril to leave the terminal bead although the latter definitely looked like a veritable ending; the fibril becomes thicker in its course, and may be traced to a long distance even in its collateral branches. Appearances of this kind may well give rise to doubts as to whether the structures described above are endings or not. After careful consideration of all these circumstances we venture to suggest that — as far as birds are concerned — there exist formations which have the appearance of nerve terminals but that they occur very rarely and cannot be said to be conclusive in every case (Fig. 13). The truth of this statement is well illustrated by Figure 13 which shows two large corneal corpuscles and part of a nerve plexus. It will be seen at first sight that the fibres of the terminal plexus pass through the body of the fibrocytes, arborize round the nucleus, and follow the anastomoses along nearly their whole length. It is also visible that while the fibre forms a knob in the protoplasm this thickening means no termination as the fibre runs on in the form of a fine connecting piece which links it with the adjacent fibre element. It is because of pictures of this nature that one has to be cautious and wary in forming definite conclusions regarding nerve terminals. A further appearance well observable in the figure is the free ending of the nerve fibre, a characteristic feature which seems to point to its intraprotoplasmatic position. Duly emphasizing the above reservations, we have to accept as facts that, first, some fibres of the terminal plexus travel in the plasm of fibrocytes in the *substantia propria* of the birds' cornea, and that, second, some of these fibres have their ending in that same plasm. In no other way can the place and position of the fibres, as they appear under the microscope, be interpreted. It is, of course, quite possible that there is a preformed groove on the surface of the cells for the fibres to run in, and this may be true also of the nerve terminals which would then be seated in a depression of the plasm. Such a possibility cannot be disregarded but the picture seen under the microscope points, in our opinion, rather to an intraprotoplasmatic position of the nerves.

Dealing with corneal innervation it would be a mistake to mention only the above described rich sensory plexuses pervading the *substantia propria*, without noting another plexus which, supplying the epithelium with sensory nerves, spreads immediately under the anteroir epithelium and pervades also the lower layers thereof. The plexus in question, with intricately interlaced fibres, is comparatively dense and may be said to be composed of two main parts one of which is a coarser plexus immediately beneath the epithelium, between the epithelial cells and the *substantia propria*, the other of them being a more loosely structured plexus in the epithelium itself. Their positions qualify both of them clearly as sensory organs. The latter has been the subject of many researches (Fig. 14). I shall revert to this question in connection with the cornea of mammals.

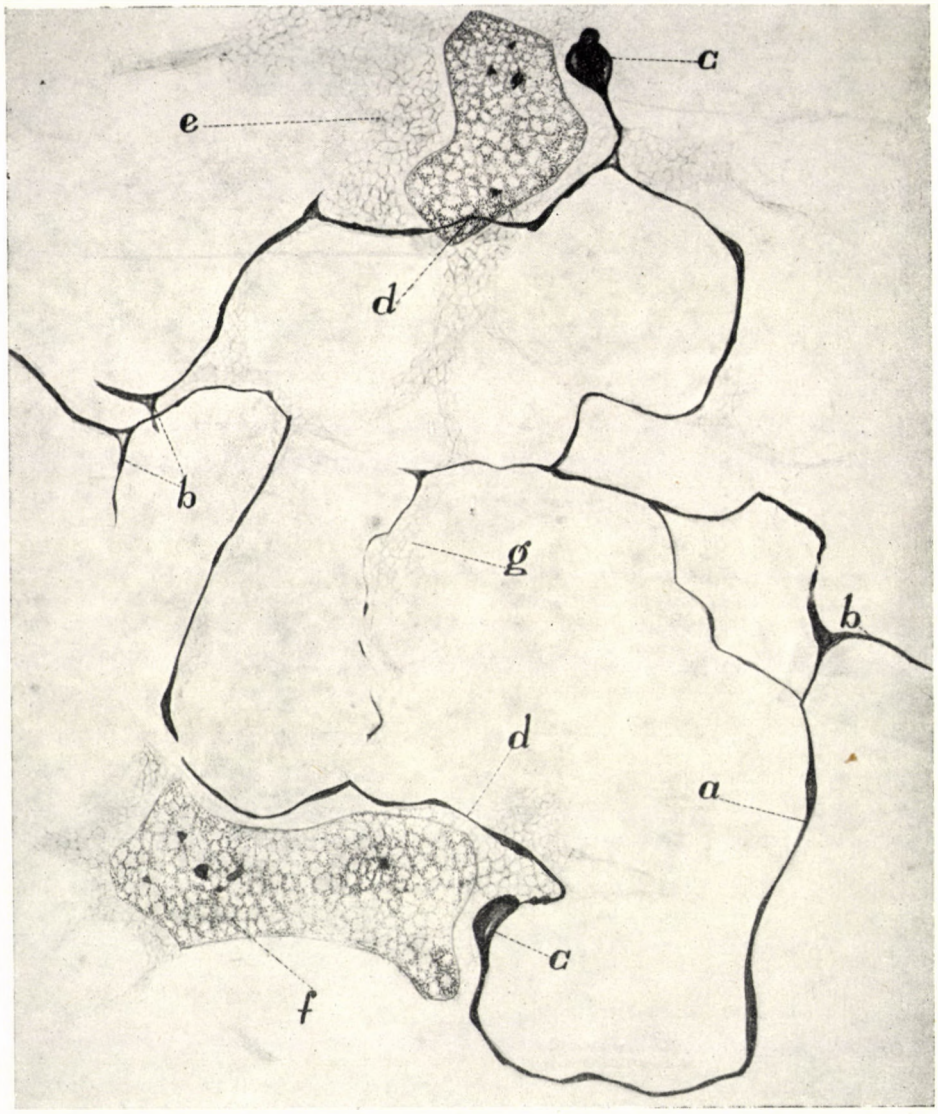


Fig. 13. Gallus domesticus L. : corneal innervation. Nerve fibres and endings in the substantia propria : *a)* nerve fibre, *b)* branching, *c)* nerve terminal, *d)* nerve fibre in the corneal corpuscle, *e)* corneal corpuscle, *f)* cell nucleus, *g)* cellular process. BIELSCHOWSKY—ÁBRAHÁM's method. Microscopic magnification 1800 ×. Photographically reduced to 2/3

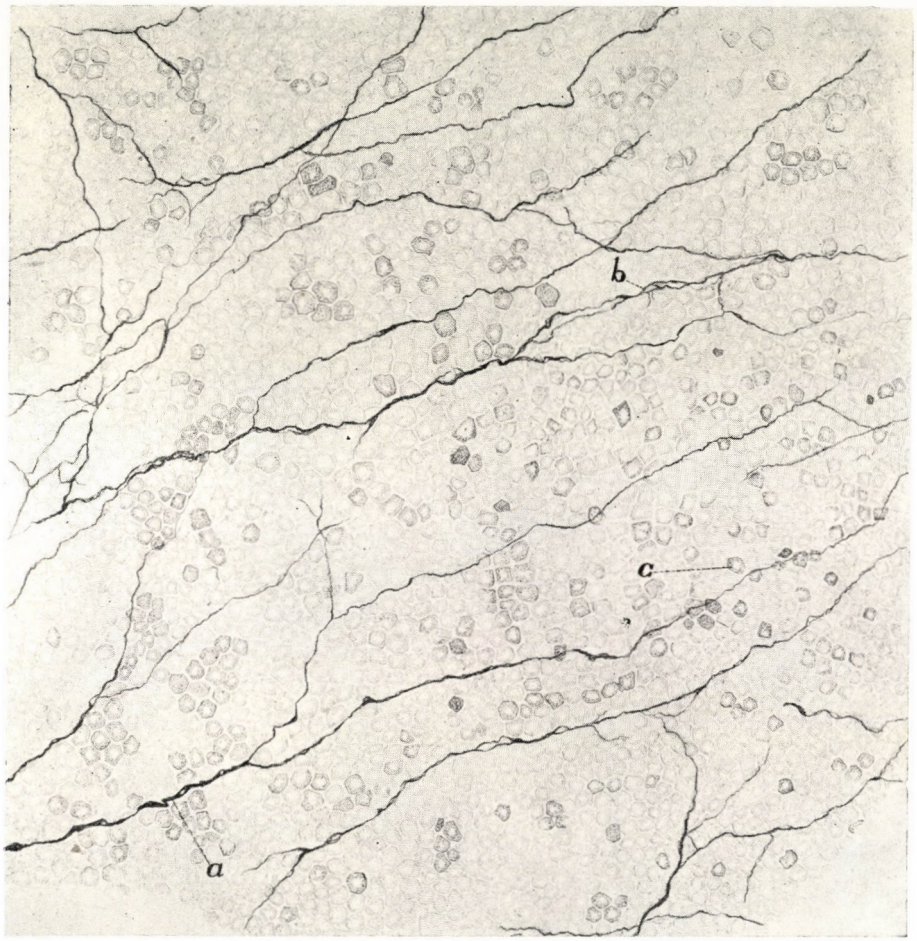


Fig. 14. Gallus domesticus L. : corneal innervation. Nerve plexus in the basal layer of the anterior epithelium : *a)* nerve fibre, *b)* meshwork of nerve fibres, *c)* epithelial cell. BIELSCHOWSKY-ÁBRAHÁM's method. Microscopic magnification 400 ×. Photographically reduced to 1/2

Mammalia

I have studied the corneal innervation in rabbits (*Oryctolagus cuniculus* L.), cats (*Felis domestica* L.), pigs (*Sus scrofa domestica* L.), cattle (*Bos taurus* K.), stags (*Cervus elaphus* L.), and horses (*Equus caballus* L.), The cornea of mammals is strongly curved. It is of variable thickness: thinner — as a rule — around the vertex, it becomes thicker towards the periphery [9]. It is disposed in the following layers :

1. anterior epithelium, 2. *substantia propria*, 3. *lamina elastica posterior* (DESCEMET's membrane), 4. endothelium or posterior epithelium. The anterior

epithelium consists of several squamous epithelial layers, and their number varies according to groups and species. There are 7 to 8 layers at the vertex of the anterior epithelium in dogs, cats and pigs, 10 in sheep and goats, and as many as 13 in horses and cattle. The boundary between epithelium and *substantia propria* runs in a straight line ; there are no papillae. The lowest of the epithelial layers is composed of high, columnar cells the nuclei of which are oval and basally seated. The cells of the layers above the cylindrical one are polygonal, with ball shaped nuclei. The cells in the upper rows are flattened, with elongated nuclei. There is no hornification in the epithelium.

The *substantia propria* consists of bundles of doubly refractive connective tissue ; these bundles resemble collagenous fibres but yield chondrin if boiled. The fibrillae are parallel to one another as also to the corneal surface. With some exceptions, the bundles are arranged in laminae. Such a vast number of fibres pass between the contiguous laminae in the cornea of cattle that the laminar structure is altogether lost from view. The large corneal corpuscles are seated between the laminated connective tissue-bundles ; the processes of these corpuscles form anastomoses.

DESCEMET's membrane (*lamina elastica posterior*) is bright and homogeneous ; it disintegrates into fine laminae if boiled, and stains dark blue if treated with resorcin-fuchsin. The thickness of the membrane varies according to species : it is — as a rule — thinner at the vertex and becomes thicker towards the periphery. DESCEMET's membrane, and the entire cornea, is rimmed towards the anterior chamber by a layer of squamous epithelium, i. e. the posterior epithelium (*endothelium camerae anterioris*). It contains angular cells with elongated nuclei, and intercellular passages between the cells.

The nerves of the cornea arise from the *plexus ciliaris*. Smaller and larger bundles of nerve fibres pass from the sclera into the cornea, and form a ringlike meshwork towards the corneal limbus in the sclera (*plexus annularis*). This plexus sends forth smaller and larger trunks which, after anastomizing with the nerves of the *conjunctiva*, enter the cornea elliptically and segmentally. Pursuing a radial course, the entering branches have a flattened shape and are disposed in several layers. The flat branches of these layers travel towards the centre, multiply repeatedly and send their fibres to the adjacent branches : the resulting pattern is a wide-meshed meshwork which was described in detail by the old authors and has recently been investigated thoroughly by REISER [12]. The occurrence of smaller and larger triangular laminae is particularly characteristic of this plexus : they appear at every point of bifurcation (Fig. 15). Seen for the first time, the triangular plates give the impression of nerve cells but higher magnifications will invariably reveal them to be anuclear laminae containing a fine plexus the nerve fibres of which remain on the same side no matter how often they pass to and fro.

The fibres in the plexuses are non-medullated, and SCHWANN's nuclei are well observable. The arborization has a characteristic pattern in the cornea of cattle, stags and horses. It is striking how much neural pictures reflect the affinity between diverse species. A fine fibrillation has frequently been observed

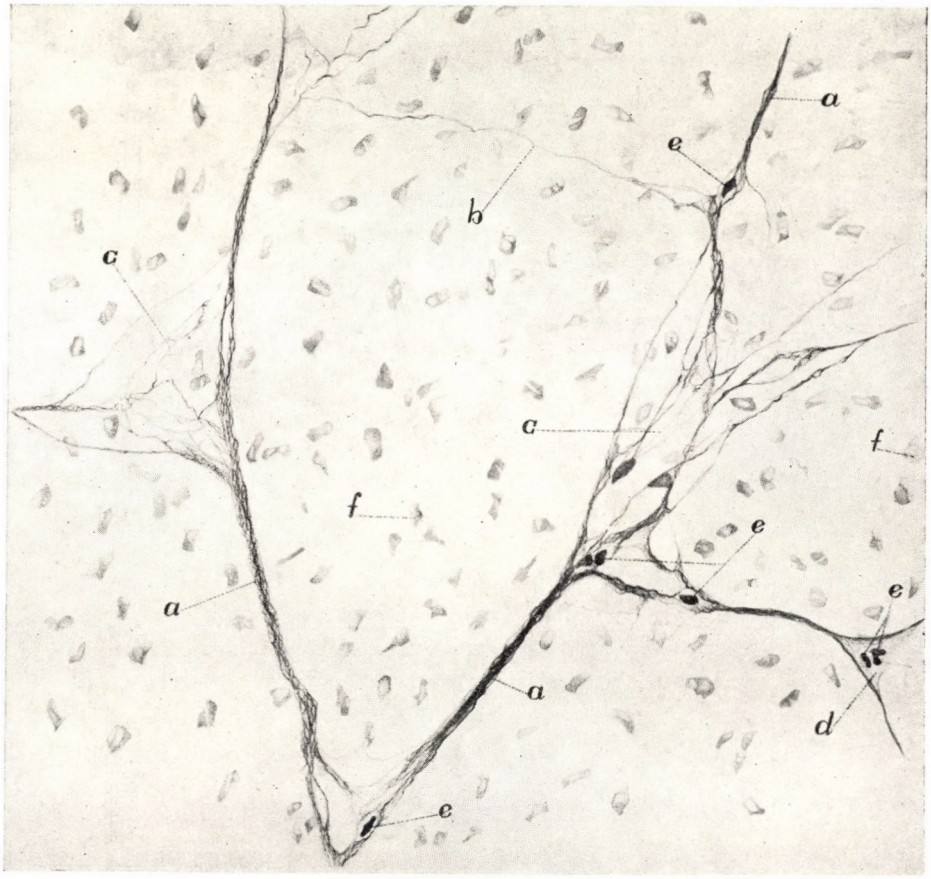


Fig 15. Bos taurus L.: corneal innervation. Nerve bundles and plexuses in the substantia propria: *a)* bundle of nerve fibres, *b)* nerve fibre, *c)* plexus of nerve fibres, *d)* nerve fibre lamina, *e)* Schwann's nucleus, *f)* connective tissue nucleus. BIELSCHOWSKY-ÁBRAHÁM's method. Microscopic magnification 150 ×. Photographically reduced to 1/2

in the corneal plexus of cattle, stags and horses, and we could also observe that, after having run to some distance, some of the fibres recur to their parent-trunk.

The nerve trunks and trunklets break up into very fine, scarcely visible varicose fibrils, and they pervade the entire *substantia propria*, especially at the edge of the anterior epithelium, in vast numbers such as are unparallelled anywhere else in the peripheral nervous system (Fig. 16). The course of these

neurofibrilla-like fibres is usually straight and only rarely curved ; it occurs sometimes — especially in cats — that the collateral branches leave the axis-cylinder at right angles : we have seen the same phenomenon in frogs, snakes and birds. The fibres can be traced to a long distance under the microscope,

Fig. 16. Bos taurus L. : corneal innervation. Nerve plexus beneath the anterior epithelium : *a)* nerve fibre, *b)* varix, *c)* ramification, *d)* corneal corpuscles, *e)* connective tissue nucleus. BIELSCHOWSKY-ÁBRAHÁM's method. Microscopic magnification 200 ×. Photographically reduced to 1/2

and even their finest ramifications are open to observation. The thick fibres in the system have no characteristic features (Fig. 17) ; they frequently form bends in their course, and are generally in a close relation to the corneal corpuscles in which some of them seem to terminate. This is still more so in the case of the fine varicose fibrils : their behaviour is the same as in birds, viz. hens and

geese, that is, they penetrate the corneal corpuscles to travel on in the processes until reaching the adjacent, then the next, cell and so forth ; in this manner whole cell-systems are laced into morphological and physiological units. Patterns of this kind are clearly visible in cats, and more especially in cattle and horses (Fig. 18).

Fig. 17. Felis domestica L. : corneal innervation. Nerve fibres in the substantia propria : *a)* thick fibre, *b)* thin fibre, *c)* varix, *d)* nerve fibre in the corneal corpuscles, *e)* corneal corpuscle, *f)* connective tissue nucleus, *g)* anastomosis. BIELSCHOWSKY-—GROSS's method. Microscopic magnification 200 ×. Photographically reduced to 1/2

The problem becomes difficult only when, here too, the question is raised whether the fibres in question terminate in the protoplasm of the cells or not. This presents the most difficult and, from the point of neurology and physiology, also the most important and most cardinal problem of the corneal innervation. So far, more than 300 publications dealing with corneal innervation in animals and man have appeared, and several of the recent papers attempted to tackle

the said problem without having brought about a uniform standpoint, and it does not seem probable that a complete agreement be reached in the near future as it is unavoidable that each investigator should evaluate his observations in accordance with his own individual conceptions, prejudices etc. The

Fig. 18. Bos taurus L.: corneal innervation. Plexus of nerve fibres in the substantia propria: *a)* nerve fibre, *b)* varix, *c)* nerve fibres in the corneal corpuscles, *d)* corneal corpuscle, *e)* connective tissue nucleus, *f)* cellular process. BIELSCHOWSKY-ÁBRAHÁM's method. Microscopic magnification 900 ×. Photographically reduced to 1/2

questions arising with regard to the innervation of the cornea, especially the nervous supply of connective tissue cells, may be classed under the following heads: 1. What is the role of the nerve fibre system in the cornea? 2. Do the nerve fibres enter the connective tissue cells? 3. Do the nerve fibres terminate in the protoplasm? 4. What is the physiological function of the connective tissue cells in the cornea?

Utilizing the recent literature, and based on our first-class preparations, I am attempting to furnish answers to these questions.

1. What is the role of the nerve fibre system in the cornea? The system of nerve fibres in the cornea constitute necessarily a sensory system, for the cornea is devoid of any tissues that could function as effector-or secretory organs. If, notwithstanding the fact that no medullary sheaths can be observed, the said fibres represent organs of sensation, then the extreme richness of the neural pattern must surely possess a special significance in the life of the *substantia propria* which not only supports but also nourishes the cornea, as it holds in its hollows the liquid it receives by way of diffusion from the terminal arteries of the sclera, and presses the superfluous part of this liquid, together with the decomposition-products, form its cavities into the terminal veins of the sclera. Adopting the phraseology of JABONERO, it is the *substantia propria* which effects hydration and dehydration, supplying nourishment in this way to all histological elements of the cornea, and, as has been said above, it is likewise the *substantia propria* which drives decomposition products into the capillary loops. This will explain the abundance of nerves and convince us that the nerve fibres serve as genuine sensory organs ; looking at the matter from this angle, all corneal nerve fibres should be regarded as being of trigeminal origin. What has been suggested in the foregoing applies, of course, to mammals and birds alike.

2. Do the nerve fibres enter the connective tissue cells? It is clear from all cornea-preparations that the nerve fibres run both beneath and above the connective tissue cells : this is not only in animals of higher but — as has been demonstrated above — also of lower species. It has moreover been ascertained that in birds, chiefly hens and geese, further in certain mammals — such as cats, cattle, stags and horses — the fibres, after having entered and traversed the connective tissue cells, travel on in the processes ; it has furthermore been observed in many preparations from horses that the nerves terminate in the cell-plasm (Fig. 19). Of course, microscopic pictures of this kind may also be interpreted differently : there are those who hold that the nerve fibres, although actually reaching the surface of the cells and their processes, are not getting into the protoplasm, so that there can be no question of their ending therein. No doubt, such a standpoint too may be justified with certain reservations, and we have seen that quite a number of authors, past and present, are in favour of it. However, if we go by the criteria presented by microscopic pictures we must — I think — necessarily reach the conclusion (and I, for one, have definitely reached it) that the nerve fibres pass into and run in the protoplasm. I have already mentioned that this opinion of mine is founded upon the fact that by bringing the cell-nucleus into focus also the nerve fibre becomes clearly visible in the cell. This being so, there is no choice left : as the nucleus is seated in the plasm, so must be the fibre too.

3. Do the nerve fibres terminate in the protoplasm? This is still a rather controversial question. Some of the recent authors think to solve the problem by postulating terminal reticula ; others refuse to believe in terminations, while some of the latest authors are completely convinced that — in man — the

Fig. 19. Equus caballus L. : corneal innervation. Nerve terminal in the corneal corpuscle : *a)* nerve fibre, *b)* neurofibril, *c)* varix, *d)* neurofibrillar interstitial lamina, *e)* corneal corpuscle, *f)* nucleus, *g)* cellular process, *h)* anastomosis, *i)* intracytoplasmatic nerve terminal in the corneal corpuscle. BIELSCHOWSKY-ÁBRAHÁM's method. Microscopic magnification 300 ×. Photographically reduced to 1/2

fibres pass through the connective tissue cells and their processes, and actually terminate in them. I have already referred to such terminations in connection with birds, and we must postulate them still more in the case of mammals. It is quite true that the nerve endings in question are not frequently seen and, if seen, not always convincing in this group either ; yet, we have found a great many intraprotoplasmatic nerve formations in the cornea of horses which were

unmistakably terminations. One of them is shown in Fig. 20. The highly magnified drawing presents the terminal arborization of a nerve fibre which closely follows one side of the cell body, and it can clearly be seen that one of the branches of the ramified terminal nerve ends in a regular terminal bead within

Fig. 20. Equus caballus L.: Nerve terminal in a corneal corpuscle. *a)* thick fibre, *b)* branching, *c)* terminal fibre, *d)* nerve terminal, *e)* corneal corpuscle, *f)* nucleus, *g)* cellular process, BIELSCHOWSKY-ÁBRAHÁM's method. Microscopic magnification 1350 ×. Photographically reduced to 3/4

the cellular process. We have two unquestionable facts in this cases : *a)* the nerve has a termination, *b)* the termination is in the protoplasm.

There is a fair number of similar nerve endings in the cornea of horses as is proved by Fig. 21 which presents fine nerve fibres attached to the cell-plasm from various sides ; we also see that each of the two terminal branches of a very fine fibre joins the cell-protoplasm by a different type of end formation.

(Fig. 21). The end formation seen to be placed in the pocket of a process is a typical one, the like of which occurs in epithelia, connective tissue membranes

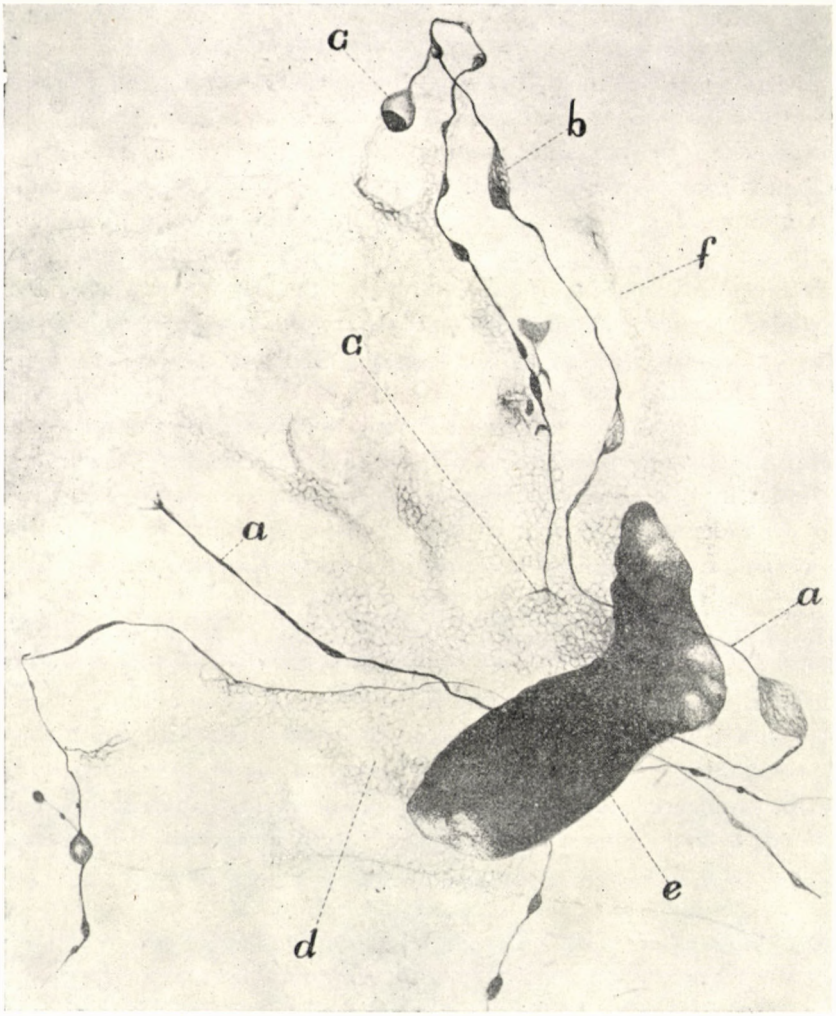


Fig. 21. Equus caballus L. : corneal innervation. Nerve terminals in a corneal corpuscle : *a)* nerve fibre, *b)* varix, *c)* nerve terminal, *d)* corneal corpuscle, *e)* connective tissue nucleus, *f)* cellular process. BIELSCHOWSKY-ÁBRAHÁM's method. Microscopic magnification 900 ×. Photographically reduced to 3/4

etc., while the other presents a less usual pattern : the nerve fibre divides into two branches in the protoplasm, and both of them disappear in the plasm without special organized endings. It seems to be certain that the nerves really terminate in these cases, and that this occurs in the cell itself. Having examined human

eyes (1953), JABONERO and LAMBERTO advocate the same theory. The three pictures published by them in this respect demonstrate fibre endings that do look like veritable nerve terminals. Of course, doubts may still arise because, unfortunately, no distinctive traits are visible such as invariably characterize fine terminal nerve systems. Nevertheless, forming my opinion by the conditions found in the cornea of birds, I took — before ever having read JABONERO's paper — the standpoint that «The existence of the own innervation of the connective tissue cells is proved in the *lamina propria* of the cornea. The fine varicose fibres pass through several cells with which they form a physiological unit, to terminate on the last cell of the eventually branching series.» [5, p. 125.] I am still in favour of this standpoint. It should, of course, be understood that I do not consider the number of terminations sufficient in comparison with the multitude of nerves, although, with the usual methods, terminations of this kind are far from appearing in great numbers in other parts either.

4. What is the physiological function of the connective tissue cells in the cornea? This question has been the subject of controversies for a long time. Assuming that the nerve fibres — or part of them at least — terminate in the cells, BOEKE who also studied the microscopic innervation of the cornea termed then «nerve-cell-like cells» distinguishing by such term the fibrocytes of the cornea from genuine fibrocytes, and giving thus to understand that he did not regard the former as genuine connective tissue cells but took them for cells with the properties of nerves. Regarded in this sense the corneal fibrocytes are identical with CAJAL's interstitial cells having the function of transmitting stimuli from receptor organs to the nerve fibres. I do not know of any other organ in which nerves terminate in connective tissue cells, consequently it is quite reasonable to regard the corneal fibrocytes as being essentially different from other connective tissue cells without, in my opinion, being justified to call them nerve cells : at most they should be termed sensory cells, in the same way as is done in other cases. From this it would follow that the cells in question are in fact stimulants because — as has been noted also by JABONERO — the stimulus, which cannot be but the abundance or lack of fluid, acts in the present case on the fibrocytes instead of directly affecting the nervous system. In this sense, corneal fibrocytes may indeed stand for sensory cells with the function of not only registering the measure of dehydration or hydration but also influencing that measure by restricting or dilating the corresponding blood vessels by way of reflexes through the vasomotor system of the capillary loops of the sclera. Thus, by giving off or taking up the necessary amount of water, they are keeping the water supply of the substantia propria always at the required level.

We propose to deal now with the innervation as observed in the outer edge of the *substantia propria* and in the anterior epithelium. As regards the former, we have not found a specially rich nervous supply either in the ver-

tebrates of the lower species or in birds, and the same may be said to apply to the majority of mammals. I was, however, struck with what I had found in horses and, to an even higher degree, in cattle. Immediately beneath the epithelium, at the edge of the *substantia propria* — a part which is much denser

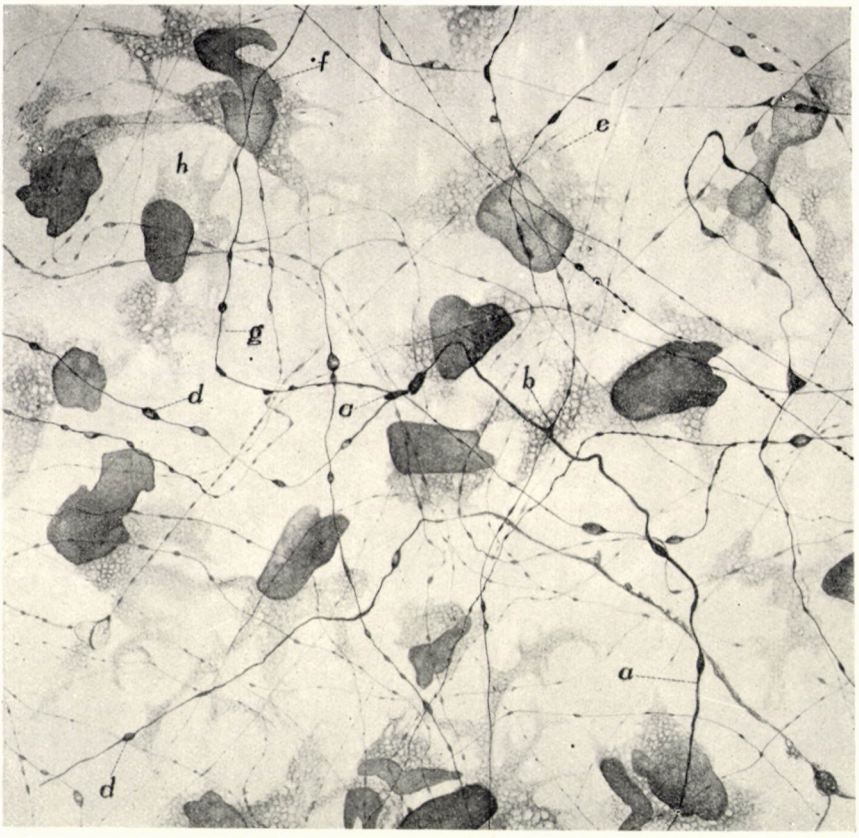


Fig. 22. Equus caballus L.: corneal innervation. Plexus of nerve fibres beneath the anterior epithelium: *a)* thick fibre, *b)* branching, *c)* ramification, *d)* varix, *e)* corneal corpuscle, *f)* connective tissue nucleus, *g)* cellular process, *h)* anastomosis. BIELSCHOWSKY-ÁBRAHÁM's method. Microscopic magnification 900 ×. Photographically reduced to 1/2

than the central parts and responds to impregnation in a different way — I observed in these animals a nerve plexus of a density the like of which I have never seen during my research-work of a few decades although I have had occasion to carefully examine thousands of preparations (Fig. 22). Some of the fibres forming the plexus are thicker: after repeated multiplication, they pass into a system of very fine terminal branches. The connection of these final branches with the thicker parent fibres is clearly observable even in microscopic pictures

of low magnification ; the branch system in question is so fine that its beaded, nodulous fibrils cannot be adequately reproduced in drawings. The microscopic picture reveals an almost endless number of very fine, clearly traceable fibres that form a veritably junglelike plexus. I want it to be understood quite clearly

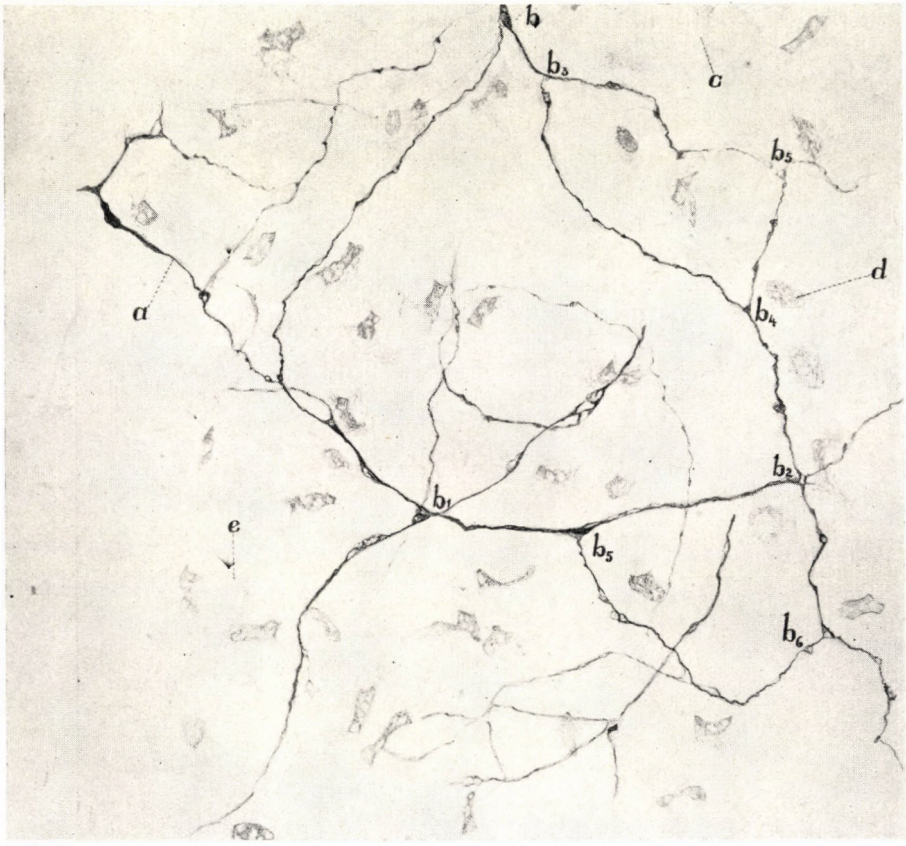


Fig. 23. Bos taurus L. : corneal innervation. Reticula of nerve fibres in the outer part of the substantia propria : *a)* nerve fibre, *b*, b_1, b_2, b_3 : reticulum I ; b_3, b_4, b_5 : reticulum II ; b_2, b_5, b_5 : reticulum III ; *c)* corneal corpuscle, *d)* cell nucleus, *e)* cellular process. BIELSCHOWSKY-ÁBRAHÁM's method. Microscopic magnification 200 ×. Photographically reduced to 1/2

that what we see here is a plexus and not a rete! It is true that there occur also a few genuine reticula imbedded in the plexuses the latter are composed of intricately intersected but always independent fibrils. This is particularly the case with cattle where the subepithelial plexus is much denser than in horses. Fig. 23 shows three closed reticula. These are genuine reticula as their fibres are actually anastomizing so that the conduction of stimulus in them has no definite direction any longer. I regard this as a very significant phenomenon

for this was actually the first instance in which I became aware of nets (retes) existing side by side with meshworks and terminal meshworks (plexuses) in the nervous system. I want to stress this point because the terms «plexus» and «reticulum» are frequently confused in literature although — as will have been understood from the aforegoing — there are but very few pictures in which genuine retes can be detected. This may, of course, follow from the fact that reticula are naturally arranged in several planes, and that thus it happens but rarely that a microscopic picture should show more than one of them, even if the picture has been taken from an area as richly provided with plexuses as the subepithelial layer in the cornea of mammals. Anyway, the occurrence of genuine reticula in the preterminal portion of the fibre system favours the theory — supported also by the preparations — that reticula may occur in the epithelium itself.

The said plexus extends unto the epithelium; moreover, the fibres immediately below the epithelium and those in the lowest epithelial layer pursue a course which is almost exactly parrallel to the surface, in the same manner as has been described in frogs and birds. Such patterns are best visible in tangential sections that are somewhat oblique, and thus reveal — partially along the lowest epithelial layer — also the nerve fibres in the uppermost part of the *substantia propria* (Fig. 24).

It has repeatedly been proved even by older authors that, arising from the upper part of the subepithelial plexus and passing through the border membrane, small bundles of nerve fibres *(rami perforantes)* enter the epithelium, and that, ramifying in the basal layer, they again form a plexus. Although these findings can be accepted by and large, my own investigations have proved that those concerning the existence of «rami perforantes» are unjustified. I think the literature owes this conception to corneal pictures prepared with GOLGI's method and stained with vital methylene blue, for the interpretation of pictures of this kind requires thick sections. My own preparations, being thin frozen sections, show no penetrating branches *(rami perforantes)*. What we see in them is that the very granularly shaped fibres of the subepithelial plexus enter the basal epithelial layer, take there — as a rule — a course that is parallel to the surface, divide into branches, and assume around the cells of the basal layer a plexiform pattern the structure and richness of which is almost identical with any other portion of the subepithelial plexus. The plexus in question may be somewhat less dense in structure but is, on the other hand, more confused owing to the great number of nuclei. This is a fact, and it applies in general to the cornea of all vertebrates. So far so good. If we go further the question becomes more difficult because, to quote REISER, «Die Erforschung der intraepithelialen Nervenversorgung ist bisher am wenigsten erfolgreich gewesen.» The reason why no exact knowledge in this respect has been reached is — also according to REISER — that «zahllose technische Schwierigkeiten versperren den Weg.»

Indeed, there were technical difficulties in the past, and they unfortunately exist in the present too. It is due to them that in spite of the great number of literary contributions there is still so much incertitude and vagueness concerning corneal innervation. We have nevertheless been successful in making prepara-

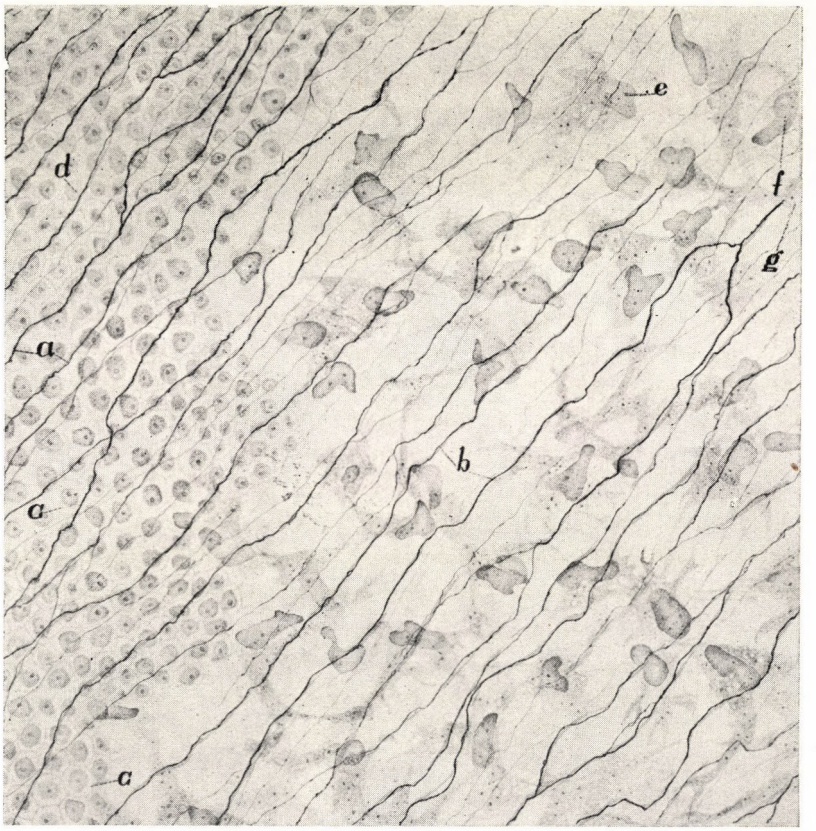


Fig. 24. Felis domestica L : corneal innervation. *a)* Nerve fibres in the basal epithelial layer, *b)* nerve fibres in the top layer of the substantia propria, *c)* epithelial cell, *d)* nucleus of epithelial cell, *e)* corneal corpuscle, *f)* cell nucleus, *g)* cellular process. BIELSCHOWSKY-GROSS's method. Microscopic magnification 400 ×. Photographically reduced to 1/2

tions from the cornea of horses, cattle and stags which are such as to help us to solve the greater part of the problems presented by the anterior epithelium. The anterior epithelium of the cornea is substantially a non-hornifying stratified squamous epithelium. Therefore, if we disregard the otherwise peculiar and unique structure and physiology of the cornea we ought to consider the innervation of the said epithelium from this angle. Doing so, the general neural picture to be expected would be this : after shedding their medullary sheath, the nerve

fibres enter the epithelium one by one or in groups, pursue in it a course at right angles to the surface, and terminate freely in any of the layers, especially in the upper ones, either in or between the epithelial tissue cells. There is no intraepithelial ramification.We should be justified to find exceptions from these rules in the following instances : the epithelium of the glans penis, the epidermis of fish, and the epithelium of the thumb-ball in frogs (ÁBRAHÁM [3]) where intraepithelial fibres run parallel to the surface ; further the epithelium of the soft palate in cattle, and the epidermis of the nasal skin in dogs where ramifications do occur. —What we actually find in the anterior epithelium of the cornea is not the expected picture but an exceedingly rich nerve plexus which, in cattle and horses, pervades the epithelium in its entire thickness. Before dealing with this plexus in detail I want to refer to the investigations that have been made in this field so as to give an appropriate background to the findings described below.

COHNHEIM was the first to report on a nerve plexus beneath the anterior epithelium of the cornea which was termed by him «subepithelial plexus». COHNHEIM and, later, MERKEL and ATTIAS found that the plexus in question was really spread out below the epithelium, whereas KOELLIKER, ENGELMANN and CREVATIN affirmed that part of the plexus was spread over the lowest epithelial layer as well. The controversy was settled by RANVIER who — before examining it — isolated the whole of the epithelium from the connective tissue. By doing so he was able to demonstrate that, as a matter of fact, a part of the subepithelial plexus pervades the basal epithelial layer.

Later, BOEKE studied the problem, and having worked on frogs and birds, claimed that the nerve fibres «im Innern der Basalzellen des Epithels ein engmaschiges sogenanntes basales Flechtwerk entstehen lassen.» BOEKE's findings were confirmed by REISER for man and animals alike. However, as regards the neural aspects of the middle and upper epithelial layers — to quote REISER — «sind unsere Kenntnisse nur gering. Eine einheitliche Meinung konnte bisher unter den Autoren nicht erzielt werden.» REISER attributes the failure to technical difficulties, especially to the fact that the cell boundaries in thick sections respond very intensely to impregnation with silver salts which «die exakte Beobachtung der gleichfalls schwarz gefärbten Nervenformationen erschwert, oft sogar unmöglich macht.» Again, in thin sections it is rarely possible «die epithelialen Nervenformationen über grössere Strecken zu Gesicht zu bekommen.» This is quite true and explains the diversity of opinions about the innervation of the said epithelial layers. While neural reticula in the middle layer have been described by PETERMÖLLER, KLEINE, RANVIER and VIRCHOW, their existence was denied by ENGELMANN, COHNHEIM and ATTIAS. EGOROW [8], on the strength of investigations made with methylene blue in guinea pigs, described from the epithelium six different types of terminal formations and a type of terminal corpuscle. He thinks the

latter to be identical with EIMER's terminal corpuscle. ZANDER and WEDDEL who in their investigations into the epithelium of the cornea used methylene blue stain, impregnation and phase-contrast methods alike, observed two types of nerve terminals. The first of them was a rarely visible, fine network of terminal nerve fibres formed by the anastomosis of so called daughter axons emerging from adjoining fibres. The second was a much more frequent type, viz. a nerve fibre coursing upward among the epithelial cells and ending somewhere between the cells with a terminal bead; this bead was usually larger than those similarly shaped nodules which preceded it along shorter or longer portions of the fibre's course. ZANDER and WEDDEL found no neural end corpuscles in the epithelium.

We see that the investigations made so far have the following result: there is an intraepithelial plexus in the basal layer of the epithelium, and the fibres of this plexus form a terminal reticulum or terminal bead either in the cells (BOEKE, REISER) or between them (ZANDER and WEDDEL.) While I accept this finding as being correct in general, I must say that — in spite of our flawless impregnations — we were unable to detect intracellular terminations anywhere. We have, on the other hand, been successful in settling the problems that had been left open by REISER, viz. the question, what happens to the nerve fibres in the middle and upper layers of the epithelium. Here, too, there is a plexus with imbedded reticulum, exactly as in the *substantia propria* where it joins the epithelium. Both the middle and upper part of the intraepithelial plexus were well impregnated in our thin and medium-thin cross sections and tangential sections made from the cornea of cattle and horses. Let us first describe the middle layer as seen in the cross sections. Fig. 25, including the epithelium from the lower third to the upper third row, reveals the intraepithelial plexus quite clearly and thus serves to prove that the plexus spreads over the entire epithelium. It is further clearly demonstrated that the fibres of the plexus are ramifying over and over, and that there are reticula within the plexus. These findings apply to the entire epithelium up to the penultimate layer, as the nerve fibres are still frequent and well observable in it. What we further see in the cross sectional pictures is that most of the fibres take a more or less longitudinal course, although there are also a few which pursue a course at right angles to the surface which latter they actually reach in many cases.

Examining now the neural picture as it looks when the tangential sections of the epithelium are impregnated (Fig. 26) we again find plexuses and reticula, isolated or coherent parts of which are visible between the epithelial cells, presenting invariably a granular appearance. The figure in question is an additional proof of the fact that the fibres of the intraepithelial plexus mostly follow a course which is parallel to the surface; part of the fibres run, at the same time, in all directions as can be ascertained from the shape, course and size of the

fibres illustrated in Fig. 25 and 26. Looking at all these pictures it seems indisputable that the whole extent of the epithelium is pervaded by an exceedingly rich and very fine nerve plexus which contains the right amount and quality of fibres for the epithelium to perform all required receptor functions.

There arises another important question in connection with the intraepithelial plexuses, namely the relation between their fibres and the cells.

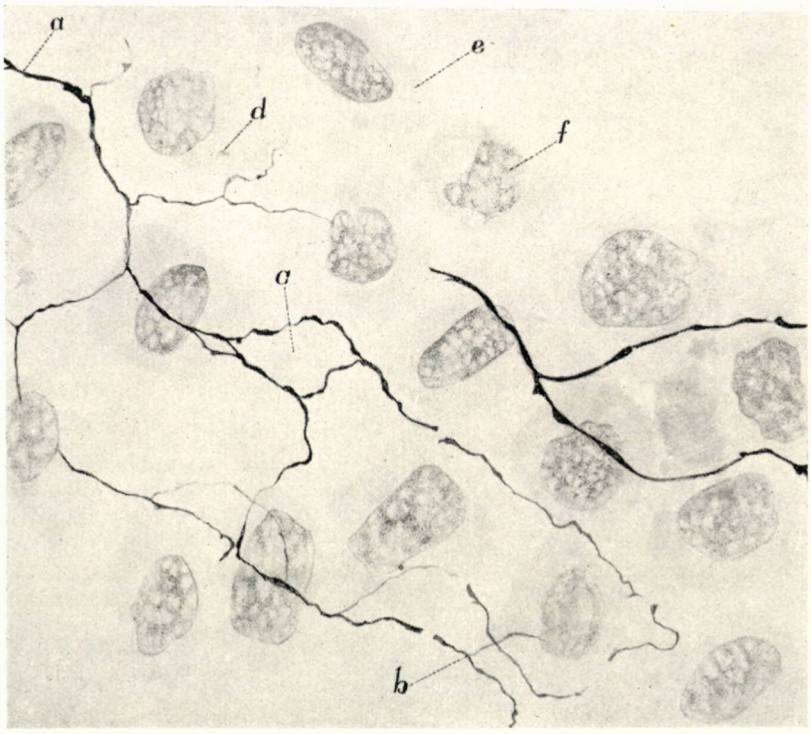


Fig. 25. Bos taurus L. : Cross section of cornea. Nerve plexus and reticulum in the upper part of the epithelium : *a)* nerve fibre, *b)* plexus of nerve fibres, *c)* reticulum, *d)* nerve terminal, *e)* epithelial cell, *f)* cell nucleus. BIELSCHOWSKY-ÁBRAHÁM's method. Microscopic magnification 1350 ×. Photographically reduced to 1/2

The preparations give us unfortunately very few clues in this respect, this fact being, of course, due to the very nature of the extremely rich intraepithelial plexus : preparations — whatever the direction of the section — always contain but a tiny part cut off the plexiformly arranged system of fibres. In these circumstances it is, of course, hardly to be expected that precisely the terminal of any fibre should get into the section, and not only that but get into it in such a manner as to show the ending to be connected with the fibre itself. Given good impregnation there will nevertheless occur a fair number of preparations of this kind too. A fibre as that shown in Fig. 27 will reveal at the first sight that

intraepithelial fibres reach up to the second top layer, terminating there — as epithelial fibres generally do — between the cells in the form of terminal beads.

Having now described the intraepithelial plexuses we ought to add that there are literary data mentioning the occurrence of terminal nerve corpuscles

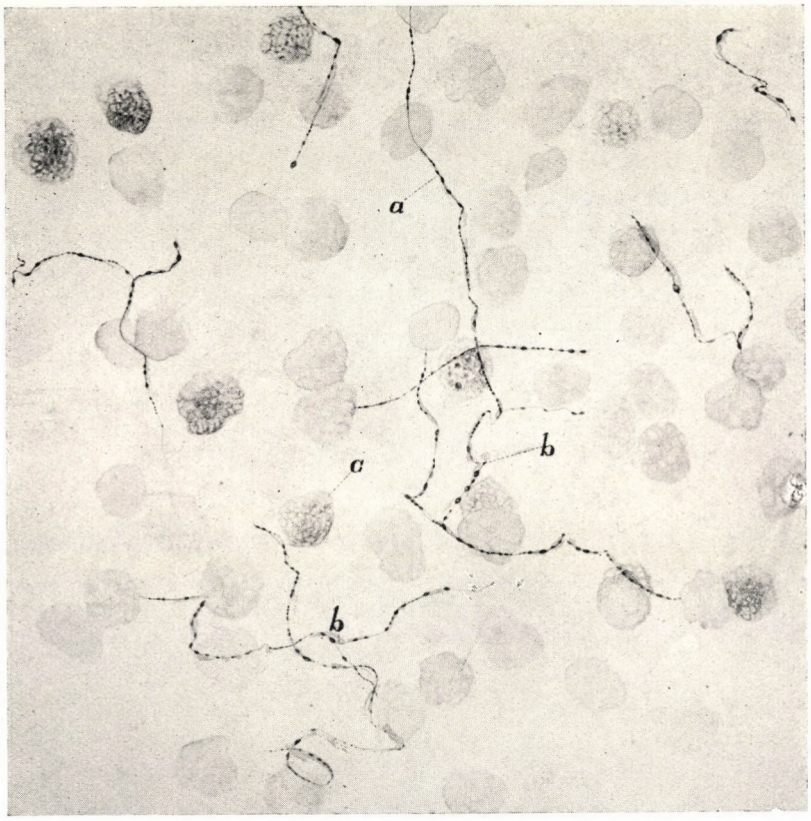


Fig. 26. Equus caballus L.: Tangential section of cornea. Nerve plexuses in the anterior epithelium: *a)* nerve fibre, *b)* nerve plexus, *c)* nucleus of epithelial cell. BIELSCHOWSKY-ÁBRAHÁM's method. Microscopic magnification 900 ×. Photographically reduced to 1/2

too in the cornea. The first notable report in this respect was that of DOGIEL [7]. Using methylene blue stain, he studied the innervation of the cornea and the conjunctiva in man. As a result of his investigations he claimed the existence of a great variety of richly fibred nerve terminals at the corneoscleral junction in the vascular zone, and illustrated his findings by very fine drawings. Neither ZANDER—WEDDEL nor I could find these terminal corpuscles. I do not doubt that these neural pictures, found in whole preparations of the cornea, were the results of misinterpretation, or else, they are artefacts.

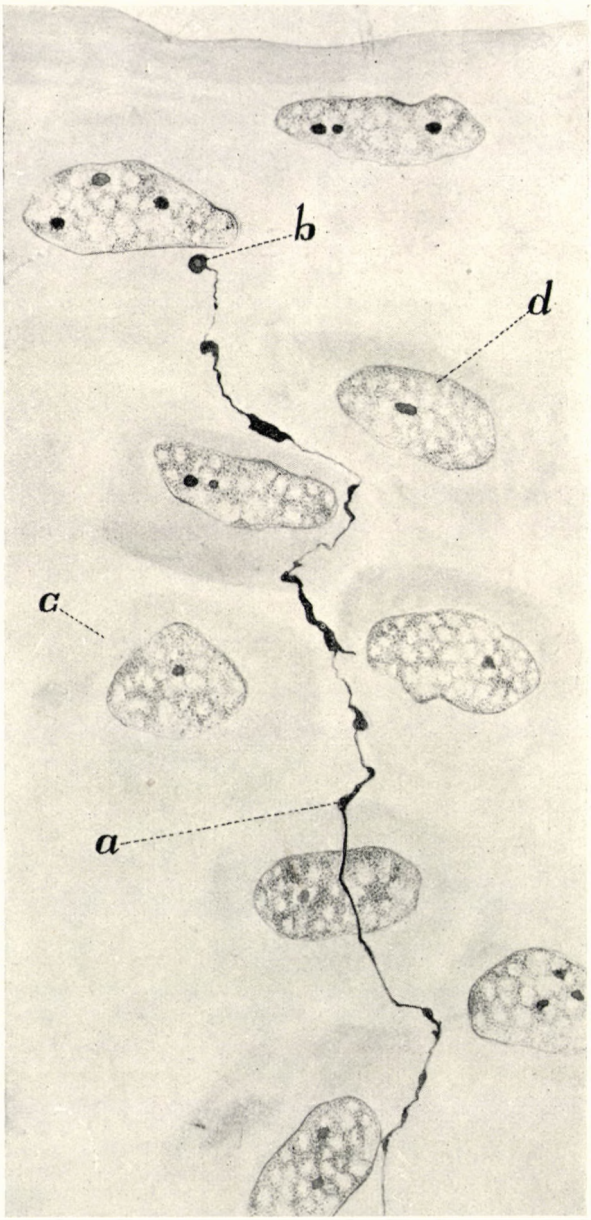


Fig. 27. Bos taurus L.: Cross section of cornea. Intraepithelial nerve fibre: *a)* intraepithelial nerve fibre, *b)* intraepithelial nerve terminal, *c)* epithelial cell, *d)* nucleus of epithelial cell. BIELSCHOWSKY-ÁBRAHÁM's method. Microscopic magnification 1300 ×. Photographically reduced to 3/4

Having likewise used methylene blue stain, various types of neural end corpuscles in the cornea of guinea pigs were described by EGOROW. The finding of these corpuscles as also of the above mentioned EIMER's organ, was simply due to mistake. Not a single one of the more than ten terminal corpuscles can be detected in correctly made and critically evaluated preparations. The main cause of the misinterpretation was, no doubt, due to an individual evaluation of the whole preparations ; it is, of course, quite possible that artefacts are responsible for these sometimes really phantastic and sometimes usually shaped terminal corpuscles the like of which we have never been able to observe during our investigations although a very abundant material, including comparative material, has been examined in their course. Our investigations have led us to the conclusion that there are no terminal nerve corpuscles in the cornea at all neither in the *substantia propria* nor in the anterior epithelium.

My sincere thanks are due to ARANKA STAMMER, my assistant, who helped to make the preparations, further to ERZSÉBET DÁNOS and ZENOBIA MOLLER, my collaborators, who prepared the drawings.

LITERATURE

1. ÁBRAHÁM, A. (1951) Die intramuralen Nerven der Kranzgefässe. *Acta Zool. Univ. Szeged*, **3,** 13—29.
2. ÁBRAHÁM, A. (1951) The comparative histology of the stellate ganglion. *Acta Biol. Hung.*, **2,** 311—354.
3. ÁBRAHÁM, A. (1952) Studies on the location and structure of the receptors of the Goltz's clasping reflex. *Acta Biol. Hung.*, **3,** 365—377.
4. ÁBRAHÁM, A. (1953) Die Innervation der Blutgefässe. *Acta Biol. Hung.*, **4,** 69—160.
5. ÁBRAHÁM, A. (1954) Innervation of the connective tissue. *Acta Morph. Hung.*, **4,** 125. (Abstract.)
6. ATTIAS, G. (1912) Die Nerven der Nornhaut des Menschen. *Graefes Arch. Ophtalmol.*, **83,** 207—316.
7. DOGIEL, A. S. (1891) Die Nervenendkörperchen (Endkolben W. KRAUSE) in der Cornea und Conjunctiva bulbi des Menschen. *Arch. Mikr. Anat.*, **37,** 602—619.
8. EGOROW, I. (1934) Nervenelemente der Cornea im Meerschweinchenauge. *Graefes Arch. Ophtalmol.*, **131,** 531—553.
9. ELLENBERGER, W. (1906) Handbuch der vergleichenden mikroskopischen Anatomie der Haustiere. Parey, Berlin.
10. JABONERO, V., LORENTE, J. (1952) The relation of the nerve fibres to the connective cells of the human cornea. *Acta Anat.*, **16,** 184—190.
11. KRAUSE, R. (1921—1924) Mikroskopische Anatomie der Wirbeltiere. Bd. I—IV. Gruyser, Berlin—Leipzig.
12. REISER, K. A. (1936) Über die Innervation der Hornhaut des Auges. *Arch. Augenheilkde.*, **109,** 251—280.
13. ZANDER, E. WEDDEL, G. (1951) Observations on the innervation of the cornea. *J. Anat.*, **85,** 68—99.

МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ ИННЕРВАЦИЯ РОГОВИЦЫ С ОСОБЫМ УЧЕТОМ НЕРВНЫХ СВЯЗЕЙ ФИБРОЦИТОВ

А. АБРАХАМ

Автор установил на основании своих исследований, проведенных при помощи методов импрегнации Бильшовского—Грос и Бильшовского—Абрахам, в связи с иннервацией роговицы рыб, лягушек, змей, черепах, птиц и млекопитающих нижеследующее :

1. Нервные волокна радиально вступают в роговицу из кольцевидного нервного сплетения, расположенного в склере на границе последней с роговицей в виде более или менее больших ствогов и пучков.

2. Плоские нервные волокна, проходящие слоисто, радиально и центрально, постепенно разветвляются, часто обменивают свои волокна, а затем переходят в сплетения, которые, тесно связываясь друг с другом, образуют один над другим систему волокон между пластинками паренхимы роговицы (**substancia propria corneae**).

3. Безмякотные нервные волокна постепенно выступают из пучков и сплетений, образуют часто вертикальные боковые разветвления, и переходят в прямые, поразительно узловатые, иногда сильно извилистые, концевые волокна, образующие у лягушек,змей и черепах параллельные, часто перекрещивающиеся системы.

4. В роговице рыб, земноводных и пресмыкающихся концевые волокна можно далеко проследить между коллагенными волокнами и фиброцитами без того, чтобы они вступали во внутреннюю связь с любым из последних. У земноводных и у пресмыкающихся иногда наблюдаются картины нервов, говорящие за то, что сильно узловатые концевые волокна входят в роговичные тельца, однако эти картины не вполне убедительны.

5. В роговице птиц и млекопитающих тонкие концевые нервные волокна заходят в фиброциты, пробегают внутриплазматически в отростках и свободно кончаются местами либо в теле клеток, либо в одном из отростков. В большинстве случаев окончания представляют собой плотные концевые головки, которые всегда гораздо больше, чем узелки в волокнах. Окончания связаны к осевой маточной нитке иногда при помощи короткого стеблевидного куска волокна.

6. Фиброциты, как интерстициальные клетки, могут при таком распределении нервных связей представлять собой стимуляторы, передающие нервной системе гидратационные и дегидратационные изменения давления, происходящие в паренхиме роговицы.

7. Иннервированные фиброциты можно рассматривать как рецепторные органы такой рефлекторной дуги, которая посредством повышения или снижения кровяного давления в кровеносных сосудах петли регулирует сокообращение роговицы и этим самым также ход питания и выделения.

8. Нервные волокна образуют на границе паренхимы роговицы и переднего эпителия особенно богатое сплетение, во внешней части которого в значительном количестве встречаются также замкнутые ретикулиновые нервные волокна.

9. Вступающие в эпителий нервные волокна пробегают в нижележащих слоях параллельно с поверхностью, а в вышележащих они образуют не только сплетения, но даже сетчатку. Выступающие из последних, или происходящие независимо от последних внутриэпителиальные волокна проходят между клетками и кончаются в верхних слоях в виде межклеточных концевых головок.

10. В роговицах исследованных автором млекопитающих он не обнаружил чувствительных пуговок, о которых в свое время сообщили Догель, а после него Егоров.

DIE MIKROSKOPISCHE INNERVATION DER HORNHAUT MIT RÜCKSICHT AUF DIE NERVENVERBINDUNGEN DER FIBROZYTEN

A. Ábrahám

Als Resultat seiner mit der imprägnierenden Methode nach Bielschowsky—Grois und Bielschowsky—Ábrahám durchgeführten Untersuchungen über die Cornea von Amphibiend Reptilien, Vögeln und Säugtieren stellt der Verfasser folgendes fest :

1. Die Nervenfasern treten in Form von kleineren und grösseren Stämmen und Bündeln aus dem sich an der Grenze der Sclera und der Cornea in der Sclera anordnenden ringförmigen Nervengeflecht radial in die Cornea ein.

2. Die geschichteten, radial und zentral verlaufenden flachen Nervenstämme verzweigen sich allmählich, wechseln häufig ihre Fasern und gehen dann in Geflechte über, die eng miteinander verknüpft zwischen den Lamellen der Substantia propria mehrere Fasernsysteme bilden.

3. Die nicht markhaltigen Fasern verlassen allmählich die Bündel und Geflechte, wobei sie häufig vertikale Seitenzweige abgeben und gehen später in auffallend gehörnte gerade, manchmal stark gewundene Endfasern über, die in Fröschen, Schlangen und Schildkröten parallele, oft sich kreuzende Systeme bilden.

4. Die Endfasern in der Hornhaut von Fischen, Amphibien und Reptilien können zwischen den kollagenen Bündeln und den Fibrozyten weithin verfolgt werden, ohne dass sie mit diesen oder jenen in innere Verbindung geraten. Manchmal zeigen sich bei den Reptilien und Amphibien Nervenformen, die dafür sprechen, dass die stark varikösen Endfasern in das Hornhautkörperchen eintreten, doch sind diese Bilder nicht ganz überzeugend.

5. Die feinen Nervendfasern in der Cornea von Vögeln und Mammalien treten in die Fibrozyten ein, sie verlaufen intrazytoplasmatisch in den Fortsätzen und enden stellenweise frei entweder in dem Zellkörperchen oder in einem der Fortsätze. Die Endungen sind in der Regel bedeutend grösser als die sich in dem Ablauf der Fasern zeigenden Varizen. Die Endungen schliessen sich manchmal in einem kurzen stielartigen Fasernstück an den Mutterachsenfaden an.

6. Bei einem derartigen Stand der Nervenverbindungen, können die Fibrozyten als interstitielle Zellen Stimulatoren sein, die die Hydratations- und Dehydratationsdruckänderungen in der Substantia propria dem Nervensystem vermitteln.

7. Die innervierten Fibrozyten können als Rezeptororgane eines Reflexbogens betrachtet werden, die durch die Erhöhung oder das Sinken des im Gefässnetz herrschenden Blutdrukes die Flüssigkeitszirkulation der Hornhaut und hiermit den Gang der Ernährung und der Exkretion regeln.

8. Die Nervenfasern bilden auf der Grenze der Substantia propria und des vorderen Epithels ein besonders reiches Geflecht, in dessen äusseren Hälfte geschlossene Nervenfasernreticula in ziemlich grosser Zahl vorkommen.

9. Die in das Epithel eintretenden Nervenfasern verlaufen in den unteren Schichten parallel mit der Oberfläche, doch bilden sie höher auch Reticula. Die aus den letzteren austretenden oder die unabhängig von diesen stammenden intraepithelialen Fasern ziehen sich zwischen den Zellen dahin und enden in den obersten Schichten in interzellulären Endknöpfchen.

10. Sensorische Endkörperchen, wie sie einst von DOGIEL und später von EGOROW beschrieben wurden, hat der Verfasser in keiner einzigen der untersuchten Cornea von Säugetieren gefunden.

AMBROSIUS ÁBRAHÁM, Szeged, Táncsics Mihály u. 2. Hungary.

DIE CILIATEN DES SICH UNTER DER FLECHTE PARMELIA SAXATILIS MASS. GEBILDETEN HUMUS

J. GELLÉRT

INSTITUT FÜR BIOLOGIE UND PARASITOLOGIE DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, SZEGED
(VORSTAND: J. GELLÉRT)

(Eingegangen am 16. Juli, 1954)

Zusammenfassung

Die sich unter der Flechte angesammelte dünne Humusschicht bildet einen zeitweiligen *Mikrobiotop*, in dem sehr reiche Mikrofauna lebt. Von den *Ciliaten* wurden 32 Spezies gefunden. Die unter der Flechte gebildete Humusschicht ist primär das Ergebnis der Tätigkeit der Flechte selbst, sekundär aber das der Gesamttätigkeit der darin lebenden Mikroorganismen. Trotz seiner Öde gewährleistet der Biotop günstige Bedingungen für eine reiche Fauna. Als solche Bedingungen müssen vor allem das unter der Flechte gebundene Wasser, sodann der während der Assimilation der in Symbiose lebenden Alge frei werdende Sauerstoff betont werden (die Durchlüftung des Biotops). Unter diesen Bedingungen muss auch die aus der Lösungswirkung des Wassers und der Pilzfäden stammende günstige Salzkonzentration angeführt werden.

Die gefundenen *Ciliaten*arten *passen sich* in grösstem Masse den durch die Umgebung gebotenen Bedingungen *an:* teils dem kleinen Wasserraum zwischen den Klumpen, teils der Periodizität des Biotops. Im allgemeinen sind sie sehr klein, ihr Körper biegsam, sie kapseln sich schnell ein, schlüpfen rasch aus und sind fähig, sich in der Zyste zu vermehren.

Die Einheit der Biozönose offenbart sich deutlich in der Nahrungskette. Ein sehr kleiner Teil ernährt sich von Bakterien, ein grösserer aber von organischem Detritus, schliesslich zerstört ein anderer grosser Teil als Raubtier die vorherigen. Ihre Ernährungsweise gibt auch der Morphologie ihrer Mundorganellen ein charakteristisches Gepräge.

Der auf die Lösungswirkung des sich unter der Flechte angesammelten Wassers sowie der Pilzfäden eingetretenen chemischen Zersetzung schliesst sich die Tätigkeit der Mikroorganismen an, deren Ergebnis die sich langsam anhäufende Humusschicht ist. Im Biotop leben in sehr grosser Arten- und Individuenzahl *Ciliaten*, die im Laufe ihrer Stoffumsatzprozesse viele Abbauprodukte der Humusbildung zufügen. Die pulsierenden Vakuolen als Nierenorgane erhöhen durch ihre Sekrete den Stickstoffgehalt des Humus.

Die eingegangenen Tiere figurieren als Humusbestandteile.

Aus dem Gesagten folgt, dass die *Ciliaten* des Bodens zur Urbodenbildung beitragen und im Leben des Bodens eine nützliche Rolle spielen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit einer Gruppe der urbodenbildenden Pflanzensukzessionen, den Flechten, bzw. mit den Ciliaten der sich *unter den Flechten* anhäufenden *Humusschicht* und mit deren Verhältnis zu der Umgebung. Um die Einheit des Lebewesens und seiner Umgebung kennenzulernen, muss man erst über die durch die Umgebung gebotenen Bedingungen unterrichtet sein.

Der Rahmen der Untersuchungen wurde durch die *Parmelia saxatilis* MASS.. gebildet. (Das gesammelte Flechtenmaterial wurde von dem Gymnasialdirektor L. GALLÉ bestimmt; für seine Freundlichkeit spreche ich ihm hiermit meinen Dank aus.) Diese Flechte ist ein felsenbewohnendes, flaches, breites Lager. Auf dem unteren Niveau des Thallus befinden sich kleine Härchen, mit deren Hilfe er sich auch an einer glatten Felsenfläche festklammern kann (Abb. 1).

Die einzelnen Lager wachsen bis zu einer Grösse von einer bis zwei Handflächen. Laut Literaturangaben [13, 20] kann die Lebensdauer des Lagers 40—50 Jahre betragen. Während dieser langen Vegetationszeit häuft sich zwischen dem Thallus- und der Felsenfläche eine Humusschicht, deren Dicke mit dem Alter und der Ausbreitung des Lagers in geradem Verhältnis steht. Diese Humusschicht gewährleistet als *Mikrobiotop* einer reichen Fauna Lebensmöglichkeiten. Von den *Ciliaten* allein wurden 32 Arten gefunden, doch waren auch *Flagellaten*,

Abb. 1: Hafthärchen auf der unteren Fläche des Flechtenlagers. Originalaufnahme, 18 ×

Amöben, *Rotatorien*, *Nematoden* und *Tardigraden* in grosser Anzahl im Biotop vorhanden.

Das Untersuchungsmaterial wurde an der südwestlichen Seite des nordöstlich vom Dorf Boldogkőváralja liegenden Hügels Magoska gesammelt. Diese Anhöhe ist der höchste Gipfel (737 m) des Gebirges von Tokaj—Eperjes im Komitat Abauj-Torna. Die ganze Gebirgsgruppe von Boldogkőváralja ist das Ergebnis der im oberen Mediterran beginnenden und bis zur sarmatischen Etage dauernden Eruption der Störungslinie entlang. Vom Standpunkt der Gesteinskunde spielen die Pyroxenandesiten in der Struktur des Magoska die wichtigste Rolle, sind jedoch in tieferen Schichten verhanden. Die oberen Schichten sind von Hypersthenaugitandesit gebildet [2]. Das trockene Flechtenmaterial wurde auf den von der Oberfläche dieser Schicht vorspringenden grauen, rötlichgrauen Felsen in einer Höhe von ungefähr 450 m gesammelt. Dieser Teil der Gebirgsseite ist von einem Hochwald mit dichtem Unterholz, an manchen Stellen mit dichtem Gebüsch bedeckt. Das erwähnte Gestein tritt im Wald an die Oberfläche und bildet vielenorts in 1—2 m Höhe hervorragende mächtige Felsblöcke. Das Untersuchungsmaterial wurde auf diesen teils schattigen, teils den Sonnenstrahlen stark ausgesetzten Felsblöcken gesammelt.

Aus der Sammelstelle der Flechtenlager und aus der Dicke der Humusschicht, die manchmal nur noch in Spuren vorhanden ist, folgt, dass es sich hier um einen zeitweiligen Biotop handelt, der lediglich bei feuchtem, niederschlagreichem Wetter die zum aktiven Leben notwendige Feuchtigkeit aufweist. Wir stehen also einem ziemlich öden Biotop gegenüber, und die Frage taucht auf, welche Umstände die Entwicklung der Mikrofauna ermöglichen.

Vor allem scheint die Rolle der in Symbiose lebenden *Alge* wichtig zu sein. Beim Assimilationsprozess der Alge wird Oxygen frei, und obwohl sich dieser Vorgang hauptsächlich auf der Oberfläche des Flechtenlagers abspielt, muss er doch mit der reichen Fauna des kleinen Wasserraums in Verbindung gebracht werden. Der frei gewordene Sauerstoff wirkt in der Durchlüftung des Humus unter der Flechte mit und sichert dadurch einen günstigeren, oxygenreicheren Biotop.

Auch den Pilzfäden kommt eine wichtige Rolle zu. Es ist allgemein bekannt, dass die Pilzfäden die Feuchtigkeit eindicken. Da das an und für sich wenige Wasser eingedickt wird, ist die wichtigste Vorbedingung, nämlich der Wasserraum, gegeben. Ferner haben die Pilzfäden nebst ihren heterotrophen Eigenschaften die Fähigkeit, anorganische Stoffe aufzunehmen, welche sie durch Säuren aus dem Material der Felsem lösen. Dieser Lösungsprozess bewirkt den chemischen Abbau des Gesteins, was wiederum Bodenbildung nach sich zieht. Den so gebildeten Boden beschützt das Flechtenlager vor dem Auswaschen durch das an der Felsenfläche herunterrinnende Regenwasser. Die winzigen Bodenkrumpen bieten einen günstigen Rahmen zum Auffangen und Speichern des Niederschlags, und wie wir noch sehen werden, kann sich bereits in dem Kapillär-Adhäsions-Wasserraum zwischen den Bodenkrumpen eine Tierwelt entwickeln. Der so herausgebildete Biotop wird insofern vom Flechtenlager beschützt, als das dichte Gewebe des Thallus sich gleichsam als eine wasserdichte Shicht über den Biotop ausbreitet und so die zur Entwicklung der Tierwelt nötige längere Lebensdauer des Wasserraums gewährleistet.

Unter den durch den Biotop gegebenen Bedingungen kann auch die Salzkonzentration eingereiht werden. Das Regenwasser ist wegen seiner Weichheit ziemlich ungeeignet zum Leben, während später die Salzkonzentration des Wasserraums infolge der Lösungswirkung des Wassers und der Pilzfäden steigt und dieser Umstand zur Entwicklung der Fauna günstigere Bedingungen sichert. Dies bestätigt wohl die Beobachtung, dass sich in dem bei Regenwetter gesammelten Material unmittelbar nach der Aufweichung — als die Exzystierungszeit im allgemeinen zu Ende war — weniger Arten befanden, später jedoch sowohl die Individuen — vie die Artenzahl, und vor allem letztere, unglaublich angewachsen sind.

Die Untersuchungen wurden von drei Hauptstandpunkten aus durchgeführt : 1. Faunistik, 2. Ökologie und 3. Urbodenbildung.

Bei der faunistischen Aufzählung wird diesmal nur auf die *Ciliaten* eingegangen, während die mit ihnen in Biozönose lebenden übrigen Mikroorganismen nicht berührt werden.

Die durch den Biotop gebotenen Bedingungen werden mit den darin lebenden Organismen in Zusammenhang gebracht ; so erhalten wir ein Bild darüber, welche Beziehung zwischen dem Lebewesen und seiner Umgebung zustande kommt, wobei die Verbindung des Lebewesens mit dem kleinen Wasserraum besonders berücksichtigt wird.

Vom Standpunkt der Urbodenbildung soll darauf hinweisen, dass die Flechten wie in der Urzeit so auch heute bei der Bodenbildung eine Rolle spielen und durch diesen Vorgang einer reichen Mikrofauna einen Biotop geben, die sich wiederum auf ihre Art und Weise in die Bodenbildung einschaltet.

Untersuchungsmethode

Es wurde stetst trockenes Material gesammelt. Das Material wurde in eine Petrischale von 15 cm Durchmesser gelegt und mit soviel Leitungswasser aufgegossen, dass es den natürlichen Feuchtigkeitszustand erreichte, der in der freien Natur beim Regenfall eintritt.

Zwecks Bestimmung der Belebung der *enzystierten* Tiere nötigen Wassermenge wurde das trockene Material in Petrischale auf ein feuchtes Filterpapier gelegt und die *aufgesaugte* Wassermenge aus dem Gewichtsunterschied des vorher gemessenen Lagers festgestellt. Während des Versuchs wurde ständig kontrolliert, welcher Feuchtigkeitsgrad *zur Belebung der Zysten* genügt. Um dies zu bestimmen, wurden Geschabsel von der durchfeuchteten unteren Fläche des Lagers genommen, auf einem Objektträgerglas mit Wasser verdünnt und sofort untersucht. An Hand dieses Verfahrens erhielt man nicht nur Angaben über den nötigen Feuchtigkeitsgrad, sondern auch die kürzeste Zeit konnte festgestellt werden, die zum Ausschlüpfen der Zysten notwendig ist. So war es auch möglich, die Reihenfolge der Erscheinung der einzelnen Protisten im Biotop zu beobachten, was wiederum vom Gesichtspunkt der sich in der Lebensgemeinschaft des Biotops herausbildenden Nahrungskette eine Bedeutung hat. Aus dem so eingebrachten und behandelten trockenen Material konnten lange Zeit hindurch wiederholt Laboratoriumskulturen bereitet werden. Eine längere Aufbewahrung des trockenen Materials verursacht keine Veränderungen in der Zusammensetzung der Fauna. Bei sorgfältiger Lagerung kann auch eine eventuelle Infektion durch fremde Zysten auf dem Luftwege vermieden werden. Im Falle eines extremen Biotops, wie die Flechte, führt übrigens selbst eine Infektion durch fremde Zysten zu keinen falschen Angaben, weil der an die Lebensumstände des Biotops nicht gewohnte Protist unfähig ist, sich zu vermehren, und in kurzer Zeit eingeht. Unabhängig davon würde sich bei der Untersuchung der wiederholt bereiteten Kulturen aus dem Material von denselben Gebieten eine eventuelle Infektion unbedingt herausstellen.

Gegenüber den in der Literatur beschriebenen indirekten Methoden [3, 19] halte ich das *direkte Untersuchungsverfahren* für viel erfolgreicher, wobei im Interesse sowohl der qaulitativen als auch der quantitativen Bestimmung die Lebewesen mit Mikroskop und Lupe unmittelbar untersucht und gezählt werden. (Auch GELEI arbeitete mit einer ähnlichen Methode.) Der auf die weiter oben beschriebene Weise eingestellten wilden Kultur wurde mittels Pipette Wasser entnommen, in Embryumschale gegeben und mit Miskroskop untersucht. So konnten die Lebensäusserungen der Protozoen genau beobachtet werden, was vom Standpunkt der Wechselwirkung zwischen dem Boden und den darin lebenden Mikroorganismen eine sehr grosse Bedeutung hat. Zur Diagnostizierung der einzelnen Arten war eine vollkommene morphologische Aufarbeitung unvermeidlich, wobei verschiedene Fixierungs- und Färbungsverfahren angewandt wurden.

Bei der quantitativen Bestimmung wurde folgende einfache Methode benutzt : Aus der Kultur wurde mittels Pipette 1 ccm Wasser entnommen, auf Objektträgerglas in kleinen Tropfen verteilt (auf 5—6 Objektträgergläsern je 16—20 Tropfen) und die Anzahl der in den einzelnen Tropfen befindlichen Tiere *(Ciliaten)* mit einer Lupe von zehnfacher Vergrösserung gezählt ; durch die Addition dieser Mengen erhält man schliesslich die Zahl der in 1 ccm Wasser befindlichen aktiven Protozoen. Während der

Zählung konnten auch die Massverhältnisse der einzelnen Arten zueinander festgestellt werden. Zur Elimination der Fehlerquellen wurde die Zählung zweimal vorgenommen, das ganze Verfahren, stets von 1 ccm ausgehend, mehrmals wiederholt und schliesslich die mittlere Proportionale als Gesamtzahl genommen. In der Berechnung kann dadurch ein Fehler entstehen, dass die Protisten in der Kultur nicht gleichmässig verteilt sind. Sie sammeln sich dort an, wo sie mehr Nahrung bekommen. Wird zufällig einer solchen Stelle Wasser entnommen, erhält man wesentlich höhere Zahlwerte. Durch die statistische Methode kann aber auch diese Fehlerquelle eliminiert werden. Wenn die Zählung während der Lebensdauer der Kultur täglich vorgenommen wird, erhält man ein Bild über die zahlenmässige Veränderungen innerhalb einer Feuchtigkeitsperiode. (Diese Bestimmung wurde im Laufe der Untersuchungen nicht durchgeführt.)

Im Zusammenhang mit der Zahl der Protozoen hat ihre Verteilung vom bodenbiologischen Standpunkt auf die *Bodenmenge* Bedeutung. Da die Humusschicht unter der Flechte, die den Gegenstand der Untersuchungen bildet, sehr dünn ist, wurde die Zahl der Protozoen nicht auf die Bodenmenge, sondern auf die Fläche der Flechte umgerechnet.

Während der Untersuchungen wurden die einzelnen Ciliaten lebend, fixiert und gefärbt beobachtet. Als Fixationsmittel wurden überwiegend eine 7%ige Sublimatlösung, in geringerem Masse ein 1%iges Osmiumperoxyd verwendet. Bei Färbung der Präparate wurden das GELEI—HORVÁTHsche [6] feuchte Versilberungsverfahren, die Opalblaufärbung nach BRESSLAU sowie die nach dem Vorbild der Opalblau Methode ausgeführte Nigrosinfärbung benutzt.

Mit der Flechte als Biotop befasste man sich bisher nur wenig. Damit lässt sich erklären, dass unter den beobachteten Protisten ziemlich viele neue Arten, ja auch eine neue Gattung gefunden worden sind, und deswegen wurde bei den Untersuchungen vor allem die Bestimmung der Zusammensetzung der Fauna als Ziel gesteckt. Die Bestimmung der einzelnen Arten und ihre Einreihung in dem KAHLschen [16] Protozoensystem verursachte sehr viele Schwierigkeiten. Diese ergaben sich daraus, dass die Systematik der Protozoen noch viel zu wünschen übrig lässt. Sie verfügt nicht über auskristallisierte Methoden und unterscheidende Artenkennzeichen, auf Grund derer zwei Arten mit völliger Sicherheit voneinander getrennt werden könnten. Unvorhergesehene Schwierigkeiten stellen sich dem Forscher bei der genauen Bestimmung der Protisten in den Weg, da sich diese als Lebewesen niedrigster Ordnung verändern. Es ist kein seltener Fall, dass eine einzige Protozoenart in ein und demselben Biotop die extremsten Beispiele der +, —Variationen vor uns erschliesst. Besonders gilt das für die Hypotrichen. Im Laufe der Untersuchungen konnte man sich immer mehr davon überzeugen, dass die Protisten zum grössten Teil lediglich im Hinblick auf ihre Umgebung zu bestimmen sind.

Beschreibung und systematische Aufzählung der gefundenen Arten

Im folgenden werden die gefundenen Arten in systematischer Reihenfolge beschrieben. Da unter diesen viele neue Arten sind, ist deren morphologische Beschreibung unvermeidlich. Bei den bekannte Arten wird natürlich nur auf die eventuellen Abweichungen von den Stammformen hingewiesen, während bei den vollkommen identischen lediglich der Name hervorgehoben wird, oder was mit dem Biotop im Zusammenhang steht.

Ordnung *Holotricha*
Unterordnung *Gymnostromata*
Familie *Holophryidae*

1. *Holophrya saginata* PENARD (1922). Anatomisch stimmt sie mit PENARDs Stammform vollkommen überein, ein Unterschied zeigt sich lediglich darin, dass sie sich nicht mit Infusorien, sondern ausschliesslich mit *Flagellaten* ernährt. Länge 80 μ.

Familie *Spathididae*

2. *Spathidium spathuloides* n. sp. Regelmässig krugförmiges Tier. Der Querschnitt des Körpers ergibt einen Kreis, die Halspartie ausgenommen, die flach ist. Die normal entwickelten und genährten Formen werden durch das Längenbreitenverhältnis von 2 : 1 charakterisiert. Länge 35 μ, die übernährten Formen werden bauchig, die ausgehungerten hingegen schlanker. Die schmale Lippe biegt sich in einem Winkel von ungefähr 35° zu der Längsachse des Körpers. Spaltenförmige Mundöffnung. In der Körpermitte ein einziger ovaler Makronukleus mit einem runden Mikronukleus. Pulsierende Vakuole terminal. Auf jeder Seite 7 Zilienreihen mit langen Wimpern. Um die Mundöffnung an der Lippe kurze Trichiten. Auf der linken Seite dorsal 3 Tastborstenreihen : die zwei inneren Reihen erstrecken sich nur der Halspartie entlang, während die dritte, äussere Reihe in der ganzen Länge des Körpers verläuft. Die Borsten sind kurz und dichter als die Zilien. Gestalt konstant. Plasma ganz hell, durchscheinend. Bewegung langsam. In Kulturen bewegt es sich gewöhnlich im Detritus. Raubtier : seine Nahrung besteht aus winzigen *Cyclidien*.

Seine Körperform ähnelt stark der des von KAHL veröffentlichten und von MOODY 1912 beschriebenen *Sp. spathula*. Auch die Zahl der Zilienreihen ist identisch. Ein *Unterschied* besteht jedoch in den kleinen Körpermassen und dem ovalen Makronukleus. Auf Grund der Ähnlichkeit erhielt es seinen Speziesnamen und wurde systematisch — da KAHL die im freien Wasser lebenden und die moosbewohnenden Formen voneinander trennt — innerhalb der letzterwähnten Gruppe wegen seiner Nukleusform vor dem *Sp. claviforme* KAHL eingereiht.

3. *Spathidium multinucleatum* n. sp. Langgestreckte Form im Verhältnis 3,5 : 1. Gestalt konstant, aber sehr biegsam. Länge 80 μ. Die Halspartie neigt leicht der Dorsalseite zu. Dorsalseite fast gerade, Ventralseite hingegen nach vorne gewölbt. Lippe schmal, nicht vorspringend. Spaltenartige Mundöffnung mit vertieften Mittelabschnitt. Die Lippe bildet kaum einen Winkel mit dem Körper, darin lange Trichiten. 22 Zilienreihen mit undichten kurzen Wimpern. Auf der linken Seite dorsal 3 Borstenreihen : 2 Reihen erstrecken sich der Halspartie entlang, die dritte, äussere bis zum letzten Fünftel des Körpers. Die kurzen Borsten sitzen dichter als die Zilien. Innerhalb der drei Reihen sind sie in den zwei kürzeren dichter. Die Kerngerüstsubstanz ist, auf 30—32 winzige Stücke verteilt, im Körper verstreut. Pulsierende Vakuole ohne Nebenvakuolen terminal gelagert, mit 4—5 Entleerungsöffnungen. Plasma hell, von der Nahrungsmenge abhängig von leicht brauner Färbung. Trotz seiner konstanten Gestalt ist es so biegsam, dass es sich vollkommen doppelt biegen kann. Die Biegung erfolgt in Richtung der linken Seite der Halspartie, also der Seite mit den Tastborsten ; bei dieser Gelegenheit hält es stets irgendeinen Klumpen zwischen den zwei Schichten des gebogenen Körpers, dann verschiebt sich die

Krümmung immer mehr dem Hinterende des Körpers zu und so rollt es gleichsam den Klumpen, den es in der Biegung eingefasst hat, bis zum Ende des Körpers. In Hinblick darauf, dass die Krümmung in Richtung der Seite mit den Borsten erfolgt, ist wahrscheinlich, dass es während der rollenden Bewegung den Klumpen mit seinen Borsten betastet (!). Bewegung sehr langsam, schwankend, bohrend. Hält sich im allgemeinen zwischen den Klumpen auf. Seine Nahrung bilden kleine Protisten, vor allem *Colpoden.*

Im System wird es in die vielkernige Gruppe der moosbewohnenden *Spathidien* neben dem *Sp. lagenula* KAHL eingereiht. Auf Grund seiner Kerngerüstsubstanz würde es dem im freien Wasser lebenden *Sp. plurinucleatum* ANDRÉ nahe stehen, doch besteht sein Kerngerüstsubstanz statt aus 20 aus 30—32 Stücken und seine Trichiten sind viel länger. Wegen der Trennung in im freien Wasser lebende und moosbewohnende Gruppen wird es in letztere eingereiht.

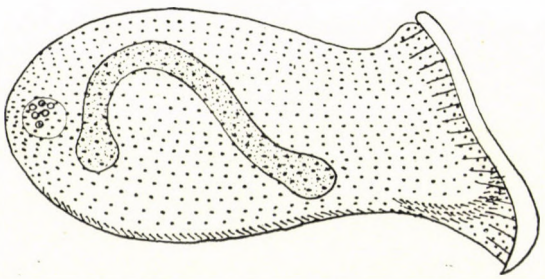


Abb. 2. Spathidium amphoriforme var. *securiforme.* Form B, nach Sublimatfixation und BRESSLAUschem opalblauem Verfahren. Ungefähr 500 ×

4. *Spathidium amphoriforme* (GREEF) var. *securiforme* (KAHL) *Form B* (Abb. 2.). Die gefundenen Exemplare stimmen lediglich bezüglich der Form, der Zahl der Zilienreihen, der mächtigen Mundöffnung und des Neigungswinkels der Lippe mit KAHLs Varietät überein. Gegenüber der von GREEF (1888) und PENARD (1922) beschriebenen Stammform *Sp. amphoriforme* schildert KAHL 2 Varietäten. Anscheinend handelt es sich um eine stark variierende Spezies. Auf Grund der Ähnlichkeit zu der var. *securiforme* wird angenommen, dass es zu dieser Varietät gehört, doch muss es davon unterschieden werden. Deshalb wird die KAHLsche Varietät als *Form A*, die vorliegende als *Form B* bezeichnet.

Es hat eine breite Milchtopfform. Massverhältnisse 2 : 1. Länge 90—100 μ (die *Kahl*sche Varietät ist 200—300 μ lang). Lange, leicht gebogene Lippe, spaltenartige Mundöffnung mit kurzen Trichiten. Der mittlere Teil der Lippen ist leicht konkav, das dorsale Ende etwas dicker. Im allgemeinen ein flaches Tier. 40 Zilienreihen mit dicht nebeneinander sitzenden kurzen Wimpern. Auf der linken Seite dorsal 2 kurze Tastborstenreihen und 1, die den ganzen Körper entlang verläuft. Die Borsten sind kurz und sitzen sehr dicht. In der Mitte des

Körpers U-förmiger Nukleus mit Öffnung nach vorne, an den Enden verdickt er sich keulenartig. Der Nukleolus wurde nicht beobachtet. Terminale pulsierende Vakoule mit 6—8 Entleerungsöffnungen. Füllt sich stets von Nebenvakuolen auf. Plasma hell mit leicht brauner Färbung. Gestalt konstant, aber ziemlich biegsam. Kann sich wie das *Sp. multinucleatum* doppelt biegen. Bewegung ganz langsam, schwerfällig. Hält sich im allgemeinen zwischen den Klumpen auf. Ernährt sich von kleinen Protozoen. Kommt nicht häufig vor und vermehrt sich nicht schnell.

5. *Spathidium muscicola* KAHL. Stimmt gewissermassen mit der Stammform überein, unterscheidet sich jedoch von dieser in vielen Beziehungen. Gegenüber dem Massverhältnis von 4 : 1 der Stammform, wurde bei dieser nur ein Verhältnis von 2,5 : 1 gefunden. Länge 80 μ, Länge der KAHLschen Form 160 μ. Gegenüber der KAHLschen Form mit 24 Zilienreihen hat diese 30. Der Nukleus ist dicker und nicht solang wie bei der typischen Form. Seiner pulsierenden Vakuole schliessen sich Nebenvakuolen an. In folgenden Beziehungen stimmen sie überein : Fundstelle, Neigungswinkel der Lippe, Dichte und Länge des U-förmigen Nukleus. Der Nukleolus konnte nicht beobachtet werden. An den Zilienreihen sitzen die einzelnen Wimpern dicht beieinander. 7 Entleerungsöffnungen. 2 kurze Tastborstenreihen und eine, die sich dem ganzen Körper entlang zieht, mit dicht sitzenden Borsten. Plasma hell, mit blassgründlicher Färbung. Langsame Bohrbewegung. Hält sich zwischen den Klumpen auf. Seine Nahrung besteht aus kleinen Protisten.

Tribus *Pleurostomata*
Familie *Amphileptidae*

6. *Bryophyllum loxophylliforme* KAHL. Nur darin unterscheidet es sich von der typischen Form, dass sein Nukleus nicht aus 30, sondern aus 36 Stücken besteht und dass es sich nicht von Rotatorien, sondern von Algen, Pilzen und pflanzlichem Detritus ernährt. Die pulsierende Vakuole füllt sich von kleinen Nebenvakuolen auf. Länge 130 μ.

Familie *Tracheliidae*

7. *Dileptus conspicuus* var. *telobivacuolatus*, n. var. (Abb. 3). Das Tier stimmt in jeder Beziehung mit *Kahls* Form überein, dennoch musste es als eine neue Varietät beschrieben werden, weil seine beiden pulsierenden Vakuolen terminal liegen, wogegen bei der typischen Form die eine Vakuole terminal, die andere in Höhe der Mundöffnung dorsal liegt. Von den beiden Vakuolen ist die ventrale stets kleiner, ihre Entleerungszeit beträgt 40 Sekunden, während die

dorsal liegende Vakuole grösser ist, mit einer Entleerungszeit von 55 Sekunden. Gegenüber der 200 μ langen Form von KAHL beträgt die Länge des vorliegenden Exemplares nur 110—120 μ. Plasma hell, bläulichgrün. Bewegung langsam, schwankend. Raubtier: ernährt sich von Protozoen. Kommt nicht häufig vor.

8. *Dileptus americanus* KAHL. Unterscheidet sich nur in den Körpermassen von der typischen Form. Die KAHLsche ist 190 μ, diese bloss 60 μ lang. Nahrung: kleine *Flagellaten*. Sehr selten.

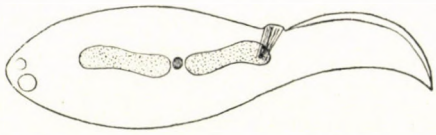


Abb. 3. Dileptus conspicuus var. *telobivacuolatus* n. var., nach Sublimatfixation. Ungefähr 330 ×

Unterordnung *Trichostomata*
Familie *Colpodidae*

9. *Colpoda cucullus* O. F. MÜLLER. Stimmt mit der Stammform überein, ist jedoch kleiner. Ihre Länge schwankt zwischen 40 und 70 μ. Bewegt sich schnell zwischen den Klumpen. Nahrung: Kugelalge.

10. *Colpoda steini* MAUPAS. Ist mit der Form von *Maupas* sowie mit der von mir beschriebenen Form aus der Moosdecke der Baumrinde vollkommen identisch, aber kleiner. Maximale Länge 20—25 μ. Plasma hell, durchscheinend. Bewegung sehr schnell, entschieden. Kommt sehr oft vor. Nahrung: Kugelalge und Pilzspross.

11. *Colpoda inflata* STOKES. Stimmt mit dem Typus vollkommen überein, ist jedoch kleiner. Der Typus ist 44—80 μ, diese hingegen 40 μ lang. Vermehrt sich sehr schnell und kommt häufig vor. Nahrung: Kugelalge.

12. *Colpoda colpidiopsis* KAHL. Ist mit dem Typus identisch. Bewegt sich sehr schnell. Länge 40 μ, die des KAHLschen Exemplares 40—50 μ. Nahrung: Bakterien.

13. *Colpoda quinquecirrata* n. sp. (Abb. 4). Sie hat in Seitenansicht eine ovale, in Vorderansicht eine Flache Form, und zwar so, dass die linke Seite ganz flach, die rechte leicht konvex ist. Das Vorderende spitzt sich etwas zu, während das Hinterende abgerundet ist, mit einer kleinen Einbuchtung in der Mitte. Auf dem präoralen oder Stirnkamm 17 Rippen, sämtliche am Ende je einer Zilienreihe. Länge 50 μ. Auf der rechten Seite wurden 29 Zilienreihen gezählt. Die Ziliatur ist sehr dicht. Mundöffnung an der Grenze des vorderen Drittels. Der flachen Form entsprechend, ist die Mundspalte auf der linken Seite ebenfalls flach, auf der rechten im Bogen gekrümmt. Der linke flache Teil ist durch eine vom Körper vorspringende Plasmaplatte begrenzt. Der kurze Schlund reicht bis

zur Linie der Querachse. Die Mundorganellen sind von typischem *Colpoda*-Charakter, mit einem unteren und einem oberen Zilienfeld. Auf der linken Seite des unteren Zilienfeldes befinden sich an dessen äusserem Ende 5 starke zirrusartige Gebilde, die steif aus der Mundöffnung hervorragen. Die fünf Borsten sind sowohl am lebenden als auch am fixierten Tier auf Grund der starken Lichtbrechung sehr gut sichtbar. Die Spezies erhielt nach diesen Borsten ihren Namen. In der Mittellinie des Körpers, etwas dorsal gelagert, ein nierenförmiger dicker Makronukleus, in seiner Krümmung ovaler Mikronukleus. Ihre einzige pulsierende Vakuole vor der Einbuchtung am Körperende.

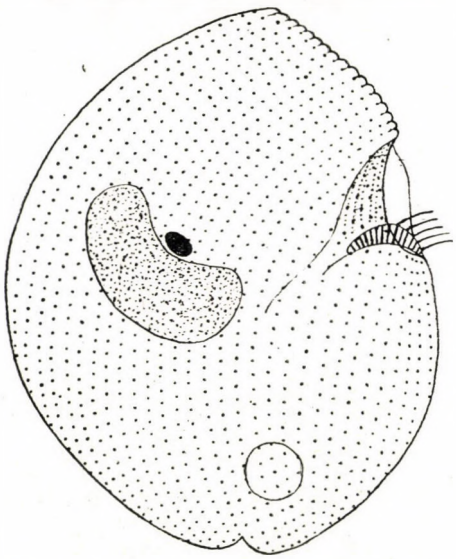


Abb. 4. Colpoda quinquecirrata n. sp., nach Sublimatfixation, Nigrosin- und Versilberungsverfahren. Ungefähr 660 ×

Plasma dunkel, von bräunlicher Färbung. Bewegung sehr schnell. Sie bewegt sich im freien Wasserraum im allgemeinen mit der linken Seite nach unten gedreht auf einer Kreisbahn, manchmal führt sie eine Bohrbewegung aus. Hält sich überwiegend zwischen den Klumpen auf. Mit der Bauchseite klammert sie sich oft an einen grösseren Klumpen und rotiert damit blitzschnell. Nahrung : Alge und Pilzfaden.

Im System wird sie dank ihrer Ähnlichkeit neben der *Colpoda patella* KAHL eingereiht. Auch in der Mundöffnung der *C. patella* kann man (nach der Abbildung KAHLS) sechs herausragende Barthaare, Borsten finden. Diese sind jedoch nicht so steif und nicht derart auffallend. Bei unseren Exemplaren ist auch die Lage der Borsten im Verhältnis zu dem unteren Zilienfeld anders, da sie alle auf der linken Seite sitzen, während sich bei der *C. patella* das äussere Ende des unteren Zilienfeldes mit der Ablaufslinie der Borsten trifft.

14. *Colpoda eurystoma* GELLÉRT (1951). Die mächtige Mundspalte des Tieres erinnert an die Mundöffnung der *Bresslaua*. Sie kommt ziemlich häufig vor und vermehrt sich schnell. Nahrung : kleine *Colpoda steini* [10].

15. *Bresslaua discoidea* KAHL. Die gefundenen Exemplare stimmen mit KAHLs Stammform überein. Lediglich in der Gestalt besteht ein Unterschied. Gegenüber der kugeligen KAHLschen Form sind diese eher birnenförmig, das Vorderende des Körpers nämlich ist, dem mächtigen vestibularen Raum entsprechend, breiter als das Hinterende. Die Masse sind etwas kleiner : 150—

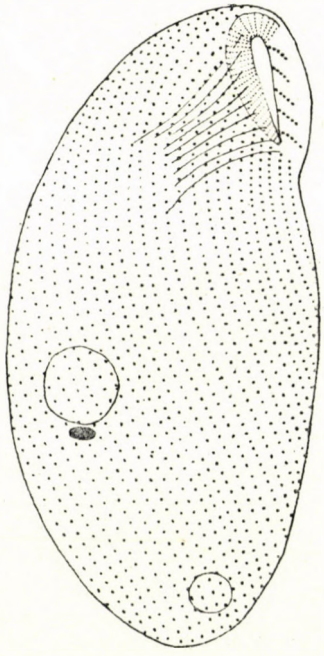


Abb. 5. Woodruffia lichenicola n. sp., nach Sublimatfixation, Nigrosin- und Versilberungsverfahren. Ungefähr 500 ×

180 μ. KAHL erwähnt keine pulsierende Vakuole. Eine interessante Erscheinung wurde beobachtet, und zwar, dass das sich neben der stätigen Vakuole den ganzen Körper umwandernde pulsierende Vakuolen bilden [11]. Ihre Nahrung besteht überwiegend aus *Colpoden*.

16. *Woodruffia lichenicola* n. sp. Gegenüber den zwei in der Literatur beschriebenen *Woodruffia*-Arten wurden unter der Flechte zwei neue Spezies gefunden. Bei beiden Arten befindet sich die Mundöffnung im Gegensatz zu der Stammform nicht auf der Seitenplatte des Schnabels, sondern an dessen Ende [15, 16].

Die *Woodruffia lichenicola* n. sp. (Abb. 5) entspricht in jeder Beziehung dem Genus-Charakter. Die Gestalt ist regelmässig oval, das obere Ende springt

vor. Am Ende dieses vorspringenden Teils finden wir die verhälnissmässig grosse Mundöffnung. Die Oberfläche des Körpers ist mit einem dichten, aber kurzen Wimperkleid bedeckt. Die Zahl der Zilienreihen ist 40, seltener 36. Die Reihen verlaufen schräg. In der Mittellinie des Körpers dorsal ein runder Makronukleus und daran geschmiegt ein linsenförmiger Mikronukleus. Pulsierende Vakuole subterminal-ventral. Das obere Ende der Mundöffnung ist breit und abgerundet, das untere Ende schliesst einen spitzen Winkel ein. Auf der linken Seite liegen

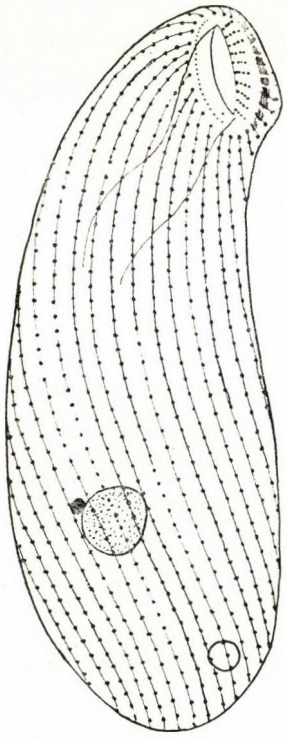


Abb. 6. Woodruffia sinistromembranellata n. sp., nach Osmiumfixation und Versilberungsverfahren. Ungefähr 500 ×

5 stark lichtbrechende Membranellen, von je 5 starken Zilien gebildet. Auf der rechten Seite ein aus ganz dünnen Zilien bestehendes Feld, innerhalb dessen die Zilien zur Mundöffnung im rechten Winkel verlaufende Reihen bilden. Das rechtsseitige Zilienfeld erstreckt sich am Vorderende der Mundspalte auch etwas auf die linke Seite. Von der Mundspalte ziehen Stützfasern in ektoplasmatischer Lage ganz bis zur Längsachse. Länge 70 μ, doch kommen auch kleinere Exemplare häufig vor. Plasma hell, durchscheinend, von blassgrüner Färbung. Körper sehr biegsam. Sie bewegt sich äusserst langsam. Schwimmt im allgemeinen auf die linke Seite gewendet, führt manchmal eine Bohrbewegung aus. Vermehrt sich

nicht schnell, kommt aber häufig vor. Ihre Nahrung besteht aus Algen und Pilzfäden.

Auf Grund der Mundorganellen reihe ich sie im System neben *Woodruffia rostrata* KAHL [16].

17. *Woodruffia sinistromembranellata* n. sp. (Abb. 6). Gurkenförmiges Tier, im Verhältnis 3 : 1 langgestreckt. Vorderende leicht gekrümmt. Das Wimperkleid ist sehr dicht, in länglichen schrägen Reihen angeordnet. 24—26 Zilienreihen. An der Grenze des letzten Körperdrittels runder Makronukleus mit ovalem Mikronukleus. In subterminal-ventraler Lage eine pulsierende Vakuole. Die Mundöffnung befindet sich auf der rechten Seite des gekrümmten Vorderendes des Körpers. Die Mundorganellen unterscheiden sich dadurch von dem allgemeinen Typus, dass sich auf der rechten Seite statt des aus Reihen bestehenden Zilienfeldes eine aus einziger Reihe bestehende undulierende Membran befindet. Auf der linken Seite gibt es 10 Membranellen, von je 4 starken Zilien gebildet. Beim äusseren Ende der Membranellen ist der Zusammenschluss der am Ende der Peristomalzilienreihen befindlichen Wimpern sichtbar. Aus den Basalkörpern zu urteilen, handelt es sich um die Verdichtung von 4—5 sehr feinen Wimpern. Länge 60—80 μ. Plasma hell, von grünlicher Färbung. Sehr biegsam. Schwimmt stets auf die Seite gewendet. Bewegung langsam. Kommt nicht häufig vor. Nahrung : Kugelalge, Pilzfaden und Pilzspross.

Auf Grund der aus einer Reihe bestehenden undulierenden Membran auf der rechten Seite der Mundöffnung reihe ich sie neben der *W. metabolica* JOHNSON —LARSON [15]. Wegen der linksseitigen Zilienverdichtung ist sie im System darüber einzuordnen.

Familie *Marynidae*

18. *Mycterothrix acuminata* n. sp. (Abb. 7). Ein an beiden Enden zugespitztes blattförmiges Tier. Ihre Länge beträgt 20 bis 25 μ. Die eine Seite des Hinterendes ist leicht eingebeult, und so endet der Körper, etwas zur Seite gedrückt, in einem spitzen Rüssel. Die Mundöffnung befindet sich in der oberen Hälfte der Einbeulung. In der zweiten Hälfte des Körpers ist ein runder Makronukleus mit Mikronukleus. Die pulsierende Vakuole befindet sich im Rüssel. Das Wimperkleid besteht aus sehr langen, weit voneinander sitzenden doppelten Zilien, in vier spiralartig verlaufenden Reihen angeordnet. Die am Ansatz des Rüssels befindliche Mundöffnung ist leicht gebogen und setzt sich in einem von hinten nach vorne ziehenden Schlund fort. Die Mundorganellen werden von einer unteren und einer oberen Bürstenorganelle (Zilienfeld) gebildet. Plasma ganz hell, durchscheinend. Bewegung sehr schnell, bohrend. Kommt häufig vor, vermehrt sich aber nicht all zu schnell. Ihre Nahrung besteht aus Bakterien.

Im System reihe ich Sie als erstes Glied der Familie *Marynidae*. Ebenso wie die *Maryniden* hat auch dieses Tier eine endständige Mundöffnung, und dem-

entsprechend zieht der Cytopharynx von hinten nach vorne. Der endständige Rüssel ist ebenfalls ein *Marynidencharakter*. Die Gliederung der Mundorganelle in eine untere und eine obere Bürstenorganelle ist ein Kennzeichen der *Maryniden*, weist aber zugleich auf die Mundstruktur der *Colpoden* hin. Die doppelte Ziliatur charakterisiert sowohl die *Colpoden* als auch die *Maryniden*. Im Hinblick darauf, dass sie, von den *Maryniden* abweichend, kein Haus baut, ihr Rüssel einfach ist, ohne Rand, und sie kein steifes Zilienknäuel von *Marynen-*

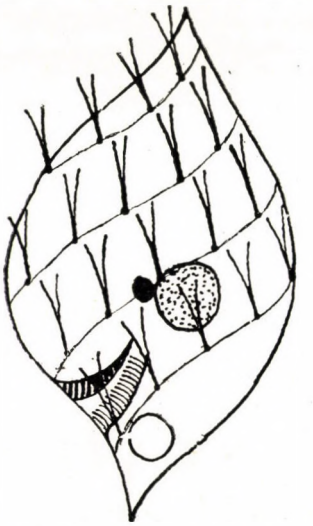


Abb. 7. Mycterothrix acuminata n. sp., nach Sublimatfixation und BRESSLAUschem opalblauem Verfahren. Ungefähr 1000 ×

charakter trägt, wird diese Form mit Rücksicht auf ihren *Marynen*charakter als erstes Glied dieser Familie eingereiht [7].

Familie *Trichopelmidae*

19. *Trichopelma stenostomata* GELLÉRT. Stimmt in jeder Beziehung mit dem von mir beschriebenen Form aus Baumrindendecke überein. Sehr kleines, sich flink bewegendes Tier. Kommt Häufig vor und vermehrt sich sehr schnell. Die neu entstandenen Tiere sind 15—20 μ lang, die ausgewachsenen 20—30 μ. Ihre Nahrung besteht aus kleinen *Flagellaten* [8].

Unterordnung *Hymenostomata*

Familie *Frontoniidae*

20. *Frontonia depressa* STOKES. Sie stimmt in allem, selbst in den Massen mit dem Typus überein. Kommt häufig vor. Länge 60—70 μ. Sie ernährt sich von Kugelalgen in grossen Mengen.

Familie *Pleuronematidae*

21. *Cyclidium muscicola* KAHL. Ist mit der Stammform vollkommen identisch. Länge 15—20 μ. Bewegt sich sehr schnell. Kommt sehr häufig vor und vermehrt sich äusserst schnell. Nahrung : Bakterien.

Ordnung *Spiroirtcha*

Unterordnung *Heterotricha*

Familie *Metopidae*

22. *Bryometopus pseudoichilodon* KAHL. Stimmt mit der von KAHL veröffentlichten Form überein. Länge 60 μ. Bewegung sehr langsam, schwebend. Nahrung : Bakterien.

Familie *Spirostomidae*

23. *Phacodinium metchnikoffi* CERTES. Ich beschrieb es bereits in einer Arbeit, in der ich mich mit seinen von der Stammform abweichenden Kennzeichen befasste [9]. Länge 80—100 μ. Bewegung langsam, bequem. Es ernährt sich überwiegend von pflanzlichen Organismen und Bakterien.

24. *Transitella lichenicola* GELLÉRT (1951). Ich beschrieb sie bereits als neues Genus in einer Arbeit. Länge 70—90 μ. Bewegung langsam. Nahrung : pflanzlicher Detritus [9].

Familie *Bursariidae*

25. *Thylacidium typicum* n. sp. Von diesem Genus ist in der zur Verfügung stehenden Literatur eine einzige Art mit dem Namen *Th. truncatum* SCHEW. berschrieben [16]. Die in geringer Anzahl gefundenen Exemplare wurden anatomisch eingehend untersucht. Gegenüber der beschriebenen Stammform scheint dieses eine typischere *Thylacidium*-Art zu sein, und wurde deswegen als eine neue Art eingereiht. Ihr Habitus verdrängt den der Stammform von SCHEWIAKOFF. Breite ovale Form. Länge 110—120 μ. Die Mundspalte erstreckt sich auf das ganze vordere Körperdrittel, ist nicht so offen wie die der Stammform und auf der linken Seite der Mundspalte gibt es keine eibauchende «Lippe». Die Strudelorganelle auf der linken Seite ist fast in ihrer Gänze geöffnet (*Thylacidium*charakter) und ihr hinteres Ende biegt sich nur in geringem Masse zurück. In der Mundgrube teilt eine Plasmamembran (Septum) auf der rechten Seite den Raum in zwei (*Bursarien*charakter). Der äussere Teil des vom Septum begrenzten Ziliatur vollständig bedeckt (*Bursarien*charakter). Die Mundöffnung setzt sich in einem bis zur Mittellinie des Körpers reichenden kurzen Schlund fort. Der Verlauf der Zilienreihen ist etwas schräg, das Wimperkleid dicht. Im vor-

deren Drittel des Körpers ein gebogener wurstartiger Makronukleus. Ein Mikronukleus konnte nicht beobachtet werden. In der Körpermitte eine einzige pulsierende Vakuole mit kreisförmiger Entleerungsöffnung. Auf dem abgrundeten Hinterende eine kleine Einbuchtung, wo sich die Afterspalte öffnet. Plasma hell, durchscheinend, von blassgrüner Färbung. Bewegung sehr langsam, schwerfällig. Kommt sehr selten vor und vermehrt sich nicht schnell. Nahrung : Bakterien.

Im System wird es als eine typischere Art als die Stammform vor dem *Th. truncatum* eingereiht, um so mehr als es auf Grund der Ziliatur des septalen Raums auch der *Bursaria* nahesteht. Wegen der geschlosseneren Mundöffnung als die der *Bursaria* hat es einen *Thylacidium*charakter, aber noch mehr, weil seine Schlundorganelle offener ist als die der Stammform.

Unterordnung *Hypotricha*
Familie *Oxytrichidae*

26. *Paraholosticha lichenicola* n. sp. (Abb. 8). Ovale Form. Länge 100 μ. Das Vorderende ist in Höhe der Strudelorganelle etwas eingebeult und dementsprechend verschmälert es sich vorne leicht. Hinterende abgerundet. Strudelorganelle sehr entwickelt, reicht bis zur Grenze des vorderen Drittels. Von hier biegt sie weit auf die andere Seite hinüber. Zahl der Membranellen : 34. Peristomale Lippe gerade, endet oben zugespitzt. Am Rand der Lippe zieht eine aus sehr langen Zilien bestehende, adorale Membran, von der nach innen zu sich von der Mitte der Lippenlänge bis zum Ende der Strudelorganelle die aus kurzen Zilien bestehende endorale Membran erstreckt.

Die Anordnung der Zirren weist einen *Paraholostichac*harakter auf. Die marginalen Zirren schliessen sich hinten nicht. Die rechtsseitige Randzirrenreihe beginnt in Höhe des oberen Endes der Lippe, nahe dem Rand und endet hinten subterminal. Die linksseitige Reihe geht vom Ansatz der peristomalen Lippe, in Höhe der Mundöffnung, aus, zieht sich graduell neben den Rand und endet hinten ebenfalls subterminal. Im Stirnraum, ganz vorne neben dem Rand, ein aus 14—18 Zirren bestehender Kranz. Dahinter, ebenfalls im Stirnraum, 2 von links nach rechts ziehende, von 3—4 Zirren gebildete kurze Reihen. Auf der Bauchseite zwei schräg verlaufende ventrale Reihen. Beide gehen von Höhe des Vorderendes der peristomalen Lippe aus, aber lediglich die rechtsseitige erreicht das Hinterende des Körpers, während die linksseitige etwas früher endet. Unmittelbar neben dem Vorderende der pellikulären Lippe steht ein einzelner Zirrus. Auf der Dorsalseite 3 vollständige Tastborstenreihen. Transversale Zirren sind nicht vorhanden. An der Grenze des vorderen und des hinteren Körperdrittels je ein ovaler Makronukleus mit je einem Mikronukleus. Pulsierende Vakuole auf der linken Seite in Höhe des Endes der Strudelorganelle. Entleerungszeit 8—10 Sekunden. Körper im allgemeinen hell, das Hinterende jedoch mit Nahrungs-

vakuolen voll und dementscprechend immer dunkler. Bewegung langsam, kriechend. Vermehrt sich sehr schnell, kommt aber nicht allzu oft vor. Nahrung: Kugelalge und pflanzlicher Detritus. Im System wurde neben der *P. muscicola* KAHL eingereiht.

27. *Paraholosticha nana* n. sp. Form oval. Länge 60—70 μ. Vorderende nach rechts verflacht. Hinterende leicht flach. Die Strudelorganelle reicht bis zur

Abb. 8. Paraholosticha lichenicola n. sp., Ventralseite, nach Sublimatfixation und Nigrosinverfahren. Ungefähr 330 ×

Grenze des vorderen Körperdrittels, besteht aus 22 Membranellen und erstreckt sich auf die rechte Seite des frontalen Raumes. Peristomale Lippe kurz, mit leicht gekrümmtem oberem Ende. In der ganzen Länge der pellikulären Lippe aus kurzen Zilien bestehende undulierende Membran, darunter eine noch kürzere endorale Membran. Die rechtseitige Randzirrenreihe geht in Höhe des Vorderendes der Lipp evom Rand aus und endet subterminal. Ebenso endet die linksseitige Reihe, die am Ende der Strudelorganelle entspringt. Die Randreihen sind hinten nicht geschlossen. Am Rand des frontalen Teils ein aus 14 Zirren bestehender Kranz, dahinter zwei einzelne Zirren, am Ende der Lippe einer.

Zwei schräg verlaufende ventrale Reihen. Die rechtsseitige ist durchlaufend, die linksseitige zieht sich lediglich bis zur Grenze des letzten Viertels. Auf der Dorsalseite 3 vollständige Tastborstenreihen. Transversale Zirren sind nicht vorhanden. Auf der Grenze des vorderen und des hinteren Drittels je ein ovaler Makronukleus mit je einem Mikronukleus. Pulsierende Vakuole auf der linken Seite beim Lippenansatz. Plasma hell, durch die Nahrung von grünlicher Färbung. Bewegung schnell, zurückfahrend. Kommt oft vor. Ernährt sich von grünen Kugelalgen.

Im System reihe ich das Tier auf Grund der kleineren Zahl der Zirren im frontalen Teil nach der *P. lichenicola*. Da es das kleinste unter den bisherigen *Paraholosticha*-Arten ist, erhielt es die Benennung «*nana*».

28. *Keronopsis alpestris* KAHL. Stimmt im grossen mit KAHLs Form überein. Die Unterschiede sind : das Vorderende dreht sich nicht ausgesprochen nach links, am Rand des frontalen Teils sitzen statt 10 nur 7 Zirren und ebenfalls im frontalen Teil befindet sich über dem Zirrus neben der peristomalen Lippe noch ein anderer Zirrus. Der Verlauf der beiden ventralen Reihen stimmt überein, mit der Ausnahme, dass die rechtsseitige Reihe als die unmittelbare Fortsetzung des Zirrenkranzes im frontalen teil entspringt. Die marginalen Reihen sind unmittelbar neben dem Rand angeordnet, während sie bei KAHLs Form etwas mehr nach innen zu stehen. Die Zahl der transversalen Zirren (5) ist identisch, doch ragen diese über dem Körper hervor. Die Strudelorganelle besteht aus weniger Membranellen und ersteckt sich vorne nicht auf die andere Seite. KAHL erwähnt keine Tastborsten, bei diesem Tier wurden drei Reihen gefunden. Lage und Zahl der Nuklei sowie die Lage der pulsierenden Vakuole sind identisch. Entleerungszeit 7 Sekunden. Plasma hell mit blassgrüner Färbung. Bewegung schnell, kletternd. Kommt häufig vor. Nahrung : pflanzlicher Detritus und Alge.

Da der Organismus des Tieres mit KAHLs Form grundsätzlich übereinstimmt, wäre es nicht begründet, es als eine neue Art einzureihen. Die Unterschiede sind vermutlich Folgen der Lebensweise in einer anderen Umgebung.

29. *Keronopsis muscorum* KAHL. Weicht sehr wenig von der Stammform ab. Die Zirrenreihe neben der peristomalen Lippe besteht statt aus 1—5 aus 7 Zirren (laut KAHL ist sie eine sehr variable Reihe). Ausserdem beträgt die Zahl der Zirren am oberen Ende der Lippe um 1 mehr. Die Zahl der transversalen Zirren ist nicht 6—9, sondern ausgesprochen 5 und sie ragen über dem Körper hervor. Auf der Dorsalseite 5 Tastborstenreihen. Die Stammform ist 250 μ lang, diese hingegen nur 120 μ. Die peristomale Lippe ist nicht so gekrümmt, doch — wie auch KAHL schreibt — ist dieses Kennzeichen ebenfalls ziemlich variabel. Die von KAHL beschriebenen Kugelkörperchen konnten nicht beobachtet werden. KAHL erwähnt keinen Nukleus, hier wurde in der Körpermitte ein einziger kugeliger Nukleus gefunden, Mikronukleus jedoch nicht wahrgenommen. Die pulsierende Vakuole mit längsseitigem Sammelkanal stimmt mit der des Typus

überein. Entleerungszeit 10 Sekunden. Bewegung sehr langsam. Das Tier dreht sein Vorderende hin und her. Ist sehr biegsam und zu einer schlängelnden Bewegung fähig. Kommt nicht oft vor und vermehrt sich auch nicht schnell. Nahrung : Pilzspross und Alge, ist also kein Raubtier, wie es KAHL beschreibt. Wird für eine von der Stammform abweichende, durch die unterschiedliche Umgebung zustande gekommene Variation gehalten.

30. *Holosticha manca* var. *mononucleata* n. var. Konstante Form, im Verhältnis 3 : 1 langgestreckt. Länge 60μ. Die rechte Seite ist fast gerade, während sich der ins erste Drittel fallende Teil der linken Seite leicht hervorwölbt. Die linke Seite des Vorderendes verflacht sich sanft. Die Strudelorganelle reicht bis zum Drittel des Körpers. Ganz kurzer Schuld, 14 Membranellen. Die rechtsseitige marginale Zirrenreihe beginnt in Lippenhöhe und endet subterminal. Die linksseitige Reihe geht vom Lippenansatz aus, dreht sich im Bogen zum Rand und endet ebenfalls subterminal. Die Wurzeln der marginalen Zirren sind von je einem lichtbrechenden Ring umgeben. Im frontalen Teil drei stärkere Zirren. Die ventralen Zirren bilden zwei leicht schräg verlaufende Reihen. Die rechtsseitige ventrale Reihe zieht bis zur Grenze des letzten Drittels, die linksseitige nur bis zur Mittellinie. Am oberen Ende der Lippe ein einzelner Zirrus. 4 transversale Zirren, die weit über dem Körper hinaus reichen. Auf der Dorsalseite 3 vollständige Borstenreihen. Ein einziger Makronukleus in der Mittellinie des Körpers. Eine pulsierende Vakuole auf der linken Seite. Das Vorderende der Lippe ist leicht gekrümmt. Plasma hell. Bewegung langsam kriechend, manchmal bohrend. Während ihrer rotierenden Bewegung um die eigene Achse hält sie die vordere Hälfte des Körpers in entgegengesetzter Richtung zu der Strudelorganelle gekrümmt. Nahrung : Pilzspross und *Flagellaten*.

Sie stimmt mit der *H. manca*-Stammform in der Biegung der Lippe, dem einzelnen Zirrus neben der Lippe und dem Verlauf der ventralen Reihen überein. Unterschiede bestehen gewissermassen in der Form, ferner dass sie nicht 5, sondern 4 transversale Zirren aufweist. Die Zahl der Nuklei werden von KAHL nicht erwähnt. Auf Grund der Unterschiede wird sie als Varietät betrachtet, besonders wegen der kleinen Zahl der Membranellen der Strudelorganelle und wegen der bei den Wurzeln der marginalen Zirren befindlichen lichtbrechenden Ringe.

31. *Holosticha manca* var. *plurinucleata* n. var. (Abb. 9). Sie stimmt in vieler Hinsicht mit der neuen Varietät der vorigen Art überein. Da die rechtsseitige ventrale Zirrenreihe durchlaufend, die linksseitige nur bis zur Körpermitte ziehend, die Zahl der transversalen Zirren 6, die Lippe gerade, die Zahl der Nuklei 22 ist, ferner da sich bei den Wurzeln der marginalen Zirren kein Ring befindet, wird sie als eine neue Varietät aufgefasst. Ihre Länge ist grösser als die vorhergehenden : 80μ. Sie ernährt sich vor allem von Pilzfäden.

32. *Amphisiella terricola* n. sp. (Abb. 10). Obwohl nach KAHLs Bestimmung sämtliche *Amphisiellen* im Meer leben, werden die gefundenen Exemplare

doch hier eingereiht, weil sie den Kriterien dieses Typus vollkommen entsprechen : eine schräge ventrale Reihe, 3 starke frontale Zirren, hinter der Lippe in 2 Reihen je 3 Zirren, 5—8 transversale Zirren, Lippe leicht gekrümmt. Das Tier ist im Vehältnis 3 : 1 langgestreckt. Form ovoid. Länge 100μ. Beide Enden abgerundet. Linke Seite konvex, rechte Seite etwas konkav. Die entwickelte Strudelorganelle reicht bis zur Grenze des ersten Körperviertels. Zahl der Membranellen 22. In der Länge der Lippe sehr entwickelte undulierende Membran. Auf der linken Seite des peristomalen Raumes, parallel zum Verlauf der Strudelorganelle, aus 6 einzelnen dickeren Zilien bestehende parorale Reihe. Der Schlund

Abb. 9. Holosticha manca var. *plurinucleata* n. var., Ventralseite nach Sublimatfixation und Nigrosinverfahren. Ungefähr 500 ×

reicht über die Linie der Längsachse hinaus. Die marginalen Zirren sind hinten nicht abgeschlossen. Die rechtsseitige Reihe geht ganz vorne neben dem Rand vom Beginn der Strudelorganelle aus, die linksseitige hingegen von der Höhe des Lippenansatzes. Vorne im frontalen Teil 3 starke Zirren. Am oberen und unteren Ende der Lippe je eine von links nach rechts ziehende und aus je 3 Zirren bestehende Reihe. Eine schräge ventrale Reihe der Mittellinie entlang, die sich von der Mitellinie der Lippe bis zur Grenze des letzten Körperviertels erstreckt. Aus 6 Zirren bestehende, kaum über den Körper hinausreichende transversale Reihe. Dorsal 3 vollständige Borstenreihen. An der Grenze des ersten und des letzten Drittels je ein in der Mittellinie liegender ovaler Makronukleus mit je einem Mikronukleus. Am Ende der Makronuklei je ein heller Querstreifen. Eine einzige pulsierende Vakuole, dorsal liegend, in Höhe des

ersten Nukleus. Entleerungszeit 16—18 Sekunden. Plasma vorne hell, hinten dunkler. Bewegung langsam, oft zurückfahrend. Ist sehr viel. Ernährt sich von kleinen Protozoen. Kommt oft vor und vermehrt sich schnell. Mit Rücksicht darauf, dass sie nicht im Meer lebt, wird sie als letztes Glied des *Amphisiella*-Genus eingereiht.

Abb. 10. Amphisiella terricola n. sp., Ventralseite, nach Sublimatfixation und BRESSLAUschem opalblauem Verfahren. Ungefähr 500 ×

Die ökologischen Verhältnisse der gefundenen Arten

Da nun die Zusammensetzung der *Ciliaten*fauna bekannt ist, soll im weiteren zusammengefasst werden, über welche Eigenschaften und Kennzeichen die einzelnen Arten verfügen und inwiefern ihre Entwicklung im Biotop gewährleistet ist. Natürlich findet man nicht alle das Bestehen der Tiere sichernde Eigenschaften in jeder Art konzentriert. Sie weisen wohl gemeinsame Eigenschaften auf, verfügen jedoch ausserdem über verschiedene Kennzeichen.

Im Zusammenhang mit der Periodizität des Biotops müssen vor allem die Ent- und Exzystierung berücksichtigt werden, weil die Besiedlung des Biotops mit diesem Vorgang beginnt. 16 Minuten nach dem Aufguss des trockenen Materials erschienen bereits die *Ciliaten*. Dies war die kürzeste von mir beob-

achtete Zeit. Dieser Umstand bedeutet jedoch nicht, dass sie sich nicht schneller beleben können ; die enzystierten Tiere schlüpfen ja nicht zugleich aus der Kapsel, sind noch in geringer Anzahl, und es ist reiner Zufall, ob sich in dem mit der Pipette herausgenommenen Wasser Tiere befinden oder nicht. Während der Untersuchungen wurde mal diese mal jene Art zuerst beobachtet, doch waren es stets ein und dieselben Arten, die als erste erschienen.

Die 16 Minuten währende, kurze Exzystierungszeit ist notwendig, weil das Tier im Zusammenhang mit der Periodizität des Biotops oft der Gefahr ausgesetzt ist, dass der Wasserraum bald austrocknet. Zur Ausnutzung der kurzen Feuchtigkeitsperiode ist die schnelle Exzystierung unbedingt erforderlich, um ein aktives Leben noch vor der Austrocknung führen zu können. Bei den meisten Arten wurde eine sehr schnelle Exzystierung beobachtet, so vor allem bei sämtlichen *Colpoda-*, *Cyclidium-*, *Mycterothrix-*, *Trichopelma-*, *Bryometopus-*, *Thylacidium-*, *Frontonia-*, *Woodruffia-*, *Transitella-*, *Phacodinium*-Arten, sowie von den *Hypotrichen* bei denjenigen, die sich von pflanzlichen Organismen ernähren. Bezüglich der schnellen Exzystierung bilden hauptsächlich die Raubtiere Ausnahmen, und zwar in erster Linie die *Spathidien*. Dies lässt sich dadurch erklären, dass sich die zur Nahrung dienenden tierischen Organismen früher vermehren müssen, weil sich sonst die Raubtiere nicht ernähren können. Eine auffallende Ausnahme bildet in dieser Hinsicht das Raubtier *Colpoda eurystoma*, das bereits am Anfang der Vegetationsperiode erscheint, da es sich von kleinen *Colpodae steini* ernährt, die im Biotop unter den ersten erscheinen und sich sehr schnell vermehren. Man kann selbstverständlich der späteren Erscheinung der Raubtiere keine genauen Grenzen setzen, weil sie anderen Faktoren zufolge auch früher erscheinen mögen, doch ist ihr massenhaftes Auftreten den obigen Feststellungen gemäss wahrgenommen worden.

Ähnlich der schnellen Exzystierung geht auch die Exzystierung in sehr kurzer Zeit vor sich. Im Zusammenhang mit dem Fortleben der Tiere im Biotop muss bei dieser Erscheinung betont werden, dass sie fähig sind, sich innerhalb der Zyste zu teilen : sich also zu vermehren. Dies konnte bei *Colpoda steini*, *Colpoda cucullus*, *Colpoda eurystoma* und *Bresslaua discoidea* zweifellos festgestellt werden. Im Hinblick darauf, dass in den Kulturen — die *Frontonia-* und *Phacodinium*-Exemplare ausgenommen — kein einziges sich teilendes Tier beobachtet werden konnte und die Individuenzahl doch anwuchs, muss man schliessen, dass die übrigen Arten den Anfang des anabiotischen Zystenzustands zur Vermehrung benutzen. Diese Erscheinung steht in engen Zusammenhang mit dem Fortbestehen im Biotop: während der Vegetationsperiode leben die Tiere aktiv, während der anabiotischen vermehren sie sich.

In Verbindung mit der Ein- und Exzystierung kann die interessante ökologische Beobachtung gemacht werden, dass die Periodizität der Vegetationszeit den biotischen und abiotischen Zustandswechseln gleichsam ein Gepräge verleiht. Es handelt sich nämlich um den Umstand, dass in Laboratoriumskultu-

ren die Individuenzahl nach einer 5—6tägigen Zucht sozusagen bis Null abnimmt, obwohl sich die Vegetationsbedingungen im wesentlichen nicht verändern. Nach einem Aufguss mit etwas frischem Wasser traten einzelne Arten in kurzer Zeit wieder in mächtiger Individuenzahl auf. Andere Arten hingegen belebten sich erst dann, wenn die Kultur vorher austrocknete und nur hinterher mit Wasser aufgegossen wurde. Offensichtlich muss man annehmen, dass bei kurzem Regen, wie die Regenschauer im Sommer, die Humusschicht unter dem Schutz des Flechtenlagers im allgemeinen lediglich ein paar Tage lang den nötigen Feuchtigkeitsgrad behält. So kapseln sich die Tiere auf die bekannte Weise ein, um sich gegen die Austrocknung zu schützen. Dieser nur einige Tage währende Feuchtigkeitszustand setzt der Dauer des aktiven Lebens eine Grenze, und die gleichsam auf dessen Wirkung auftretende «erworbene Eigenschaft» ist ein charakteristisches Kennzeichen sämtlicher unter Flechtenlagern lebenden *Ciliaten* geworden. Übrigens ist es ja auch bekannt, dass bei einzelnen *Ciliaten* die Ein- und Exzystierung, von den Umweltsfaktoren selbst unabhängig, zu einem Lebenszyklus geworden ist. Im Flechtenbiotop ist dieser Zyklus noch ausgeprägter.

Die Körpermasse müssen als charakteristische Kennzeichen ebenfalls hervorgehoben werden. Im allgemeinen wurden kleine Tiere unter 100μ gefunden, kaum waren einige Arten, die diese Länge überragten: *Bresslaua discoidea* (110—180μ), *Dileptus conspicuus* var. *telabivacuolatus* (110—120μ), *Thylacidium typicum* (100—120μ) und *Keronopsis muscorum* (120μ). Die übrigen Formen sind alle 60—80μ bzw. 15—50μ lang (Tab. I). Offensichtlich begünstigen die kleinen Körpermasse die Lebensfähigkeit im kleinen Wasserraum. Für das Tier ist das um so wichtiger, als — wie wir noch später sehen werden — eine unglaublich geringe Wassermenge zur Belebung genügt.

Ausser den Körpermassen müssen der allgemeine *Habitus* und die *Biegsamkeit* des Körpers hervorgehoben werden. Die gefundenen Arten sind mit wenigen Ausnahmen *flach*, ihr Körper *langgestreckt*, von spitzer Keilform. Dank dieser Gestalt können sie in den winzigen Wasserräumen zwischen dem Detritus leichter vorwärtskommen und sich überhaupt bewegen. Es ist für sie möglich, in den Detritus einzudringen und sich an die Klumpen zu schmiegen. Diese flache Körperform wird also auch dadurch bestimmt, dass sich der Wasserraum in dünne Schichten teilt. Dieser Gestalt gesellt sich bei einzelnen Arten die Biegsamkeit des Körpers zu, die ebenfalls die Bewegung zwischen den Klumpen ermöglicht. Naturgemäss findet man auch hier Ausnahmen, wie z. B. in erster Linie die *Bresslaua discoidea* und das *Thylacidium typicum*, die sich jedoch im Biotop nicht vermehren. Im allgemeinen beherrschen die kleinen, flachen Tiere sowohl bezüglich der Arten- als auch der Individuenzahl den Biotop.

Schnelle Bewegung wurde lediglich bei kleinen Formen wahrgenommen, die grösseren bewegen sich langsam, schwerfällig. Im kleinen Wasserraum könnte dies gar nicht ander sein.

Weiter oben wurde bereits erwähnt, dass das frisch gefallene und im Biotop aufgespeicherte Regenwasser eine sehr weiche, süsse Umgebung bildet, später jedoch die Konzentration durch die Lösungswirkung des Wassers und die lösend-verdauende Wirkung der Pilzfäden erhöht wird. Diese Erscheinung wirkt auch auf die Vegetation. Wenn nach dem Regen Lebewesen auftreten, finden sie noch ein sehr weiches Wasser, das die Tiere infolge der Anschwemmung mit Wasser einer Hypervakuolisation aussetzen könnte. Diese tritt jedoch nicht ein, weil die Entleerungsfrequenz der pulsierenden Vakuolen sehr hoch ist : im allgemeinen 7—14 Sekunden. Bei grossen Formen wächst die Frequenz im Verhältnis zu den Körpermasse nicht wesentlich, sondern neben den ursprünglichen Vakuolen treten entweder Nebenvakuolen *(Spathidium amphoriforme)* oder ein durch den Körper hinziehender Sammelkanal *(Keronopsis muscorum)* oder aber bei der 180μ langen *Bresslaua discoidea* wandernde pulsierende Vakuolen auf, die von der Plasmaströmung getragen im ganzen Körper herumgehen. Die hohe Frequenz und die Bildung der Ersatzvakuolen sind auch deshalb notwendig, da das Tier während der Enzystierung Wasser abgibt, die innere Konzentration grösser wird, und so der Protist unmittelbar nach dem Ausschlüpfen, wenn die Permeabilität der Pellikula noch grösser ist, der Weichheit des Regenwassers zufolge in eine hypotonische Umgebung gelänge, die für ihn unbedingt schädlich wäre. Die gesteigerte Regulationstätigkeit der pulsierenden Vakuole tritt jedoch durch die hohe Entleerungsfrequenz und durch die Bildung der Nebenvakuolen dazwischen. Später gleicht sich diese durch das Wachsen der Konzentration aus.

Die Tiere können fast ohne Ausnahme gut fixiert und gefärbt werden. Lediglich die *Mycterothrix-*, *Phacodinium-* und *Bryometopus*-Arten vertrugen die Bresslausche opalblaue Eintrocknung nicht. Dies lässt darauf schliessen, dass ihre Pellikula dick ist. Die dicke Pellikula ist hingegen weniger permeabel und sichert einen gewissen Schutz gegen die Überschwemmung des Wassers. Dieser Schutz wird durch die Beobachtungen an einer *Amöbe* erhellt. In demselben Biotop — wie weiter oben bereits erwähnt wurde — leben auch *Amöben* in ziemlich grosser Anzahl. Bei einer zur *terricola*-Gruppe gehörenden Art wurde festgestellt, dass die Entleerungszeit der pulsierenden Vakuole 10—11 Minuten beträgt. Das Tier hat eine derart dicke Pellikula, das nach dem Eingehen der Individuen bestehen bleibt und sogar photographiert werden kann. Auch andere Beobachtungen (Faltenbildung, sie wird von *Ciliaten* durchbohrt) zeugen für die Dicke der Pellikula. In unserem Biotop mit weichem Wasser kann die 10—11 Minuten dauernde Entleerungszeit offensichtlich nur der aus der Dicke und Konsistenz der Pellikula stammenden niedrigen Permeabilität zugeschrieben werden [11, 17].

Es ist interessant, zu untersuchen, in welchem Zusammenhang die Auftrittsfolge der Arten im Biotop mit ihrer *Ernährungsweise* steht. Man konnte feststellen, dass sich beim Regen zuerst die Bakterienflora belebt, doch auch

die *Pilz-* und *Algen*vegetation intensiv entwickelt. Nur danach erscheinen die *Flagellaten* und schliesslich die *Ciliaten*. Mit der Vermehrung der als Nahrung dienenden Organismen hängt die Vermährung der *Ciliaten* in der ihrer Ernährungsweise entsprechenden Reihenfolge eng zusammen. Laut Tab. II vermehren sich zuerst die Bakterien sowie Bakterien und pflanzliche Organismen fressende *Ciliaten*. Fast zu gleicher Zeit treten auch die sich allein von pflanzlichen Organismen, von Detritus ernährenden Formen auf. Letztere vermehren sich jedoch weniger schnell als die ersteren. Erst nach dem die *Flagellaten* und die ersten *Ciliaten* erschienen sind, beginnen sich die Raubtiere zu entwickeln, und zwar zuerst die *Flagellaten* fressenden, anschliessend die sich von *Ciliaten* ernährenden.

Die Biozönose des Biotops offenbart sich sehr schön in der *Nahrungskette*. Von den gefundenen 32 Arten ernährten sich nur 5 ausschliesslich von Bakterien und 1 von Bakterien und pflanzlichem Detritus, die Bakterienflora wurde somit lediglich durch ein Fünftel der *Ciliaten* zerstört. Der grösste Teil ernährte sich von Pilzen, Algen und Detritus. Schliesslich figurierten 12 Arten als Raubtiere ; von diesen frassen 4 *Flagellaten* und 8 *Ciliaten*. Die im Verhältnis zu den Bakterien grossen Protozoen können zweifellos sehr viele Bakterien zerstören. Wenn man jedoch berücksichtigt, dass im Flechtenbiotop die Anzahl der sich von Bakterien ernährenden Tiere sehr gering, im Gegensatz zu diesen die der Raubtiere, die eben die Bakterien fressenden *Colpoden* und *Cycliden* zerstören, höher ist, so wird die bakterienzerstörende Wirkung der Protozoen schon im vorhinein unbedeutend, selbst wenn wir sehen, dass die Individuenzahl der bakterienfressenden die höchste ist. Im Zusammenhang mit der einerseites bakterienfressenden, anderseits reissenden Lebensweise der Protozoen muss ihre bedeutende Rolle in der Gewährleistung des *biologischen Gleichgewichts* betont werden. Die bakterienzerstörende Wirkung wird durch die Raubtiere ausgeglichen, die Bakterienflora hingegen durch die ganze Fauna reguliert [18].

Die Mundorganellen der Tiere in Betracht ziehend, kann folgendes festgestellt werden: Mit Ausnahme der *Hypotrichen* steht die Entwicklung der Mundorganellen mit der Ernährungsweise im Zusammenhang. Von den *Hypotrichen* ist hingegen bekannt, dass ihre Mundorganellen jeder Ernährungsweise entsprechen. Sie können durch ihre mächtige Strudelorganelle eine Strudelwirkung zustande bringen, mit deren Hilfe sie jede Nahrung ohne Hindernisse einverleiben können. Für den Flechtenbiotop gilt dies um so mehr, als die Zahl der reisenden *Hypotrichen* sehr klein ist und diese Arten selbst die sich bewegende Nahrung leicht fressen mögen. Nur ein einziger *Hypotrichus (Amphisiella)* wurde gefunden, der *Ciliaten* frass. Die Mundöffnung und die Mundorganellen sämtlicher Bakterien- und Pflanzenfresser entsprechen der sicheren Aufnahme der Nahrung. Bei den Bakterienfressern, deren Körper grösser ist *(Bryometopus, Thylacidium, Phacodinium, Transitella)*, werden wir sehen, dass sich zur Aufnahme des dem grossen Körper nötigen Nahrungsplus diese Protisten teils

durch die Masse der Mundöffnung, teils durch die Entwicklung der Mundorganellen anpassen (mächtige Strudelorganelle).

Ein schönes Beispiel der sich der Ernährungsweise entsprechend herausgebildeten Mundöffnung ist bei den Raubtieren ersichtlich. Bei den *Spathidien*, die eine verhältnismässig kleine Mundöffnung haben, dehnt sich diese in grossem Masse und auch die Trichiten an der Lippe helfen beim Verschlingen der Nahrung. Bei den Raubtieren *Bresslaua discoidea* und *Colpoda eurystoma* gewährleistet die grosse Mundöffnung die Aufnahme der Nahrung in entsprechender Menge. Dazu kommt noch bei der *Bresslaua* eine gewisse Geschlossenheit des mächtigen Schlundtrichters (das Opfer kann sich nicht befreien), die *Colpoda eurystoma* hingegen gleicht die Offenheit ihres mächtigen vestibulaten Raumes damit aus, dass sie diesen nötigenfalls auch verschliessen kann. In einer besonderen Arbeit [10] über diese Colpodenart wurde ausführlich beschrieben, dass, nachdem die als Nahrung dienenden kleinen *Colpoden* in den vestibularen Raum gelangt sind, diese mit ihrem Vorderende den Eingang verschliesst und dadurch das eventuelle Entfliehen der Opfer verhindert.

Ein übersichtliches Bild der funktionellen Zusammenhänge zwischen dem Biotop und den Lebenwesen wird in Tab. I gegeben.

Nun muss die Wassermenge besprochen werden. Die Protozoen sind als ausgesprochen wasserbevohnende Organismen bekannt. Die Frage taucht auf, welche Wassermenge genügend ist, um die Protozoen zu beleben. Zur Bestimmung dieser geringsten Wassermenge wurde ein vor einem Jahr gesammeltes trockenes Flechtenlager am Boden einer Petrischale auf ein befeuchtetes Filterpapier gelegt und beobachtet, wann im Biotop Lebewesen erscheinen. Die Flechte wurde vorher abgewogen, auf Grund des Gewichtsunterschiedes konnte das Gewicht der aufgesaugten Wassermenge festgestellt werden. Im Laufe des Versuches wurde der unteren Fläche des Lagers abgeschabtes Material entnommen, mit etwas Wasser verdünnt und unter der Lupe sofort untersucht, ob darin bereits Lebewesen zu finden sind oder nicht. Der Gewichtsunterschied wurde natürlich erst dann gemessen, als der erste Protist erschien.

Die so erhaltenen Angaben sind jedoch nicht genügend zuverlässlich, weil wegen der Unebenheit des Lagers lediglich dessen einzelne Teile unmittelbar das feuchte Papier berühren konnten, der Gewichtsunterschied wird aber auf das ganze Lager bezogen und nicht nur auf den Teil, der durch Berührung Wasser aufgenommen hat. Bei einem 2,05 g schweren trockenen Lager betrug das Gewicht des aufgesaugten Wassers 0,61 g, als darin Lebewesen erschienen. Bedeutender jedoch als dieser Versuch ist die Feststellung, dass bei der Berührungsstelle der Flechte und der darunter befindlichen Humusschicht mit dem feuchten Papier das Wasser nur durch Aufsaugung zwischen die Klumpen gelangen konnte und so die Humusschicht lediglich die an der Grenze der Kapillarität stehende hygroskop-adhärente Wassermenge enthielt. In Tropfenform war darin kein Wasser vorhanden. Trotzdem wurden in dem so durch-

feuchteten agbeschabten Material nicht nur Ciliaten, sondern auch Amöben und Rotatorien gefunden. Diese einfache Beobachtung weist darauf hin, dass sich der Biotop selbst bei solch geringer Wassermenge bevölkern kann. Da er kein Wasser in Tropfenform enthielt, kann er eigentlich nicht als ein ausgesprochener Wasserbiotop genommen werden. Dass jedoch darin Leben entstand, zeigt, dass es sich hier um einen besonderen Biotop handelt, der trotz seines Festlandcharakters wasserbewohnenden Organismen Lebensmöglichkeiten bietet. Die Frage taucht auf, ob man hier nicht ein Beispiel dafür sieht dass, wasserbewohnende Organismen zu Landtieren werden. Bei einzelnen Amöben konnte mit Sicherheit festgestellt werden, dass sie sich nicht enzystieren, sondern einfach eintrocknen, was für die obige Annahme spricht.

Wie ersichtlich, bietet einerseits der Biotop günstige Bedingungen, anderseits passen sich die Protozoen im grössten Masse den durch die Umgebung bestimmten Bedingungen an. Neben den günstigen Bedingungen wirken aber die extremen Temperaturwerte ungünstig, ja verheerend auf die Protisten. Im enzystierten Zustand vertragen sie jedoch den Frost im Winter gut. Dies wird dadurch bewiesen, dass nach einem starken Winter aus dem noch während des Frostes gesammelten Material sämtliche Arten zum Vorschein gekommen sind. Demgegenüber sind die Flechtenlager an manchen Stellen einer sehr starken Insolation ausgesetzt. Die starke Erwärmung wird noch dadurch gesteigert, dass die durchhitzte Felsenoberfläche ebenfalls Wärme ausströmt. Laut den Untersuchungen können die Protozoen im Zustand der anabiotischen Zyste auch diese starke Erwärmung vertragen. Im Zusammenhang damit muss die Bedeutung der schnellen Einzystierung hervorgehoben werden. Nach dem Regen folgt oft sehr rasch ein starker Sonnenschein, der den Biotop gar bald austrocknet ; würden die Tiere nicht fähig sein, sich schnell einzukapseln, so würden sie eintrocknen und zugrunde gehen. Selbst unter diesen Umständen fallen sehr viele Protisten der plötzlichen Austrocknung zum Opfer.

Es wäre interessant, festzustellen, welche von den 32 gefundenen Ciliatenarten ausgesprochen flechtenbewohnende : lichenobionte, welche nur Flechten begünstigende : lichenophile und schliesslich welche lichenoxene : Flechten besuchende Arten sind, die in Zystenform durch den Wind von einem anderen Biotop hierher gelangten und ihre Anwesenheit lediglich dem Zufall verdenken. Die bisherigen Untersuchungen der von ein und demselben Gebiet gesammelten Moosdecken weisen darauf hin, dass diese mit wenigen Ausnahmen durch dieselben Arten bevölkert sind ; die Ausnahmen ergeben sich vor allem daraus, dass im Moos noch ein paar Arten mehr leben. Die obigen Fragen können erst dann beantwortet werden, wenn die Ciliaten der zweiten Pflanzensukzession, der Moose, sodann die des Blätterkompostes und schliesslich die des Waldbodens ebenfalls bearbeitet sein werden. Im Hinblick auf die wahrgenommene Artenidentität des Flechten- und des Moosbiotops wird es noch nicht für begründet gehalten, zur Zusammenfassung der mit den Umgebungs-Wirkungs-

Tabelle

Die ökologischen Verhältnisse der im Humus unter der Flechte lebenden Ciliaten

Nr.	Name der Arten	Masse in Mikron		Nahrung		Bewegung	Gestalt
		Eigene	Kahl	Eigene	Kahl		
1	*Holophrya saginata*	80	70—80	Flagellaten	Infusorien, Flagellaten	Langsam, bohrend	Konstant, zylindrisch, verschmälert sich am Vorderende, keilförmig
	Spathidium spathuloides n. sp.	35	—	Ciliaten	—	Langsam, manchmal bohrend, sich versteckend	Konstant, zylindrisch, vorne flach, keilförmig
3	*Spathidium multinucleatum* n. sp.	80	—	Ciliaten	—	Sehr langsam, schwankend	Biegsame Form, sich vorne verflachend, keilförmig
4	*Spathidium amphoriforme* var. *securiforme*, Form B	90—100	200—300	Ciliaten	—	Sehr langsam, schwerfällig	Konstant, lateral verflacht, etwas biegsam, vorne keilförmig flach
5	*Spathidium muscicola*	80	160	Ciliaten	—	Langsam, bohrend	Zylindrisch, sehr biegsam, vorne keilförmig flach
6	*Bryophyllum loxophylliforme*	130	160	Pilze und Algen	Rotatorien	Sehr langsam, rutschend	Lateral flach, biegsame Form
7	*Dileptus conspicuus* var. *telobivacuolatus*	120	200	Ciliaten	—	Sehr langsam, schwankend	Zylindrische konstante Form, sehr biegsamer Rüssel
8	*Dileptus americanus*	60	190—220	Flagellaten	—	Langsam, schwankend	Zylindrische Form, sehr biegsamer Körper und Rüssel
9	*Colpoda cucullus*	40—70	80	Algen	Bakterien	Schnell, schwimmend, kriechend	Konstante ovale Form
10	*Colpoda steini*	20—25	32—40	Pilze und Algen	Bakterien	Sehr schnell, bohrend	Konstante runde Form
11	*Colpoda inflata*	40	44—80	Algen	—	Schnell, bohrend	Konstante zylindrische Form
12	*Colpoda colpidiopsis*	40	40—50	Bakterien	—	Sehr schnell, bohrend	Konstante zylindrische Form
13	*Colpoda quinquecirrata* n. sp.	50	—	Pilze und Algen	—	Sehr schnell, bohrend	Lateral verflacht, konstante Form
14	*Colpoda eurystoma*	60—100	—	Ciliaten	—	Langsam	Dorso-ventral verflacht, mit biegsamen Vorderende
15	*Bresslaua discoidea*	150—180	200	Ciliaten	Ciliaten	Sehr langsam, bequem	Konstante zylindrische Form
16	*Woodruffia lichenicola* n. sp.	70	—	Pilze und Algen	—	Sehr langsam, schwimmend, bohrend	Sehr, biegsam, lateral flach

17	*Woodruffia sinistromembranellata* n. sp.	60—80	—	Pilze und Algen	—	Langsam, schwimmend, bohrend	Sehr bigesam, lateral flach
18	*Mycterothrix acuminata* n. sp.	20—25	—	Bakterien	—	Sehr schnell, bohrend	Konstante Form, vorne bohrerförmig zugespitzt
19	*Trichopelma stenostomata*	20—30	—	Flagellaten	—	Sehr schnell, schwimmend	Lateral flach, konstante Form
20	*Frontonia depressa*	60—70	60—80	Algen	Infusorien, Rhizopoda, *Nostoc*	Langsam, schwimmend	Etwas verflacht, ovale konstante Form
21	*Cyclidium muscicola*	15—20	20	Bakterien	Bakterien	Sehr schnell, springend	Konstante ovoide Form
22	*Bryometopus pseudochilodon*	60	70	Bakterien	Bakterien	Sehr langsam, schwebend	Dorso-ventral flach, konstante Form
23	*Phacodinium metchnikoffi*	80—100	100	Bakterien, Detritus	Infusorien, Bakterien, Algen	Langsam, schwimmend, kreiselnd	Dorso-ventral flach, konstante Form
24	*Transitella lichenicola*	70—90	—	Detritus	—	Langsam, schwimmend, bohrend	Verflacht, konstante Form
25	*Thylacidium typicum* n. sp.	110—120	—	Bakterien	—	Sehr langsam, schwerfällig schwimmend	Ovoide konstante Form
26	*Paraholosticha lichenicola* n. sp.	100	—	Algen und Detritus	—	Langsam, kriechend	Dorso-ventral flach, konstante Form
27	*Paraholosticha nana* n. sp.	60—70	—	Algen und Detritus	—	Schnell, kriechend, zurückfahrend	Dorso-ventral flach, konstante Form
28	*Keronopsis alpestris*	70—80	80—110	Algen und Detritus	Infusorien Algen	Schnell, kriechend	Dorso-ventral flach, konstante Form
29	*Keronopsis muscorum*	120	200—300	Pilze und Algen	Infusorien	Sehr langsam, schlängelnd	Sehr biegsam, lange nematoide Form
30	*Holosticha manca* var. *mononucleata* n. var.	60	—	Pilze und Flagellaten	—	Langsam, kriechend	Dorso-ventral flach, konstante Form
31	*Holosticha manca* var. *plurinucleata* n. var.	80	—	Pilze	—	Langsam, kriechend	Dorso-ventral flach, konstante Form
32	*Amphisiella terricola* n. sp.	100	—	Ciliaten	—	Sehr langsam, kriechend, zurückfahrend	Dorso-ventral flach, konstante Form

Tabelle II

Ernährungsbiologische Verteilung der Arten

Bakterien-Fresser	Pilz-Fresser	Algen-Fresser	Detritus-Fresser	Flagellaten fressende Raubtiere	Ciliaten fressende Raubtiere
Colpoda colpidiopsis	*Holosticha manca* var. *plurinucleata*	*Bryophyllum loxophylliforme*	*Phacodinium metchnikoffi*	*Holosticha manca* var. *mononucleata*	*Spathidium spathuloides*
Mycterothrix acuminata	*Bryophyllum loxophylliforme*	*Colpoda steini*	*Paraholosticha lichenicola*	*Holophrya saginata*	*Spathidium multinucleatum*
Cyclidium muscicola	*Colpoda steini*	*Colpoda quinquecirrata*	*Paraholosticha nana*	*Dileptus americanus*	*Spathidium amphoriforme* var. *securiforme*, Form B
Bryometopus pseudochilodon	*Colpoda quinquecirrata*	*Woodruffia lichenicola*	*Keronopsis alpestris*	*Trichopelma stenostomata*	*Spathidium muscicola*
Thylacidium typicum	*Woodruffia lichenicola*	*Woodruffia sinistromembranellata*	*Transitella lichenicola*		*Dileptus conspicuus* var *telobivacuolatus*
Phacodinium metchnikoffi	*Woodruffia sinistromembranellata*	*Keronopsis muscorum*			*Colpoda eurystoma*
	Keronopsis muscorum	*Colpoda cucullus*			*Bresslaua discoidea*
	Holosticha manca var. *mononucleata*	*Colpoda inflata*			*Amphisiella terricola*
		Frontonia depressa			
		Paraholosticha lichenicola			
		Paraholosticha nana			
		Keronopsis alpestris			

faktoren dieses geschlossenen Flechtenbiotops im Zusammenhang stehenden artenkonstanten Ciliatenwelt durch den Fachausdruck «Lichenon» eine neue hydrobiologische Benennung einzuführen. Auf Grund der bisherigen vergleichenden Untersuchungen hinsichtlich dieser beiden Biotope wird eher die Entfaltung einer dem Begriff «Lichenobryon» entsprechenden Ciliatenwelt sichtbar.

Die Rolle der Protozoen in der Urbodenbildung

Auf Grund des Gesagten konnten wir den Biotop mit seinen Wirkungsfaktoren, die allgemeine Zusammensetzung der darin lebenden Ciliatenwelt sowie den Zusammenhang der Lebewesen mit dem Biotop kennenlernen. Es muss nun untersucht werden, welche Rolle die Ciliaten in der Humusbildung unter der Flechte spielen, wie sie sich in den durch die Nahrungskette gebildeten Stoffverkehr einschalten und wie sich dadurch die Biozönose der im Biotop lebenden Organismen ausgestaltet. Wenn wir über die Einheit des Lebewesens und seiner Umgebung sprechen, müssen wir auf die Einheit verweisen, laut der sie gegenseitig aufeinander wirken. Demgemäss müssen die Ciliaten ebenfalls auf ihre Umgebung wirken und dies erfolgt auch tatsächlich. Problematisch ist lediglich, welchen Einfluss dieser gegenseitige Zusammenhang auf die Humusbildung ausübt.

Den Lebensprozessen der Protozoen zufolge versammeln sich Abbauprodukte im Biotop. Im Hinblick auf die grosse Arten- und Individuenzahl müssen diese in der Humusbildung unbedingt eine wichtige Rolle spielen. Im Laufe der Untersuchungen wurde danach getrachtet, festzustellen, wie viele Ciliaten in einer gewissen Wassermengeneinheit leben. Die diesbezüglichen Feststellungen beziehen sich natürlich auf Laboratoriumskulturen; berücksichtigen wir aber, dass sich im Freien, eben den natürlicheren Bedingungen zufolge, eine reichere Fauna als die in Laboratoriumskulturen entwickeln kann, ist es offensichtlich, dass die Werte höher sein werden. Nach mehrfacher Zählung ergab es sich, dass in 0,5 ml Zuchtwasser im allgemeinen 500—600 Ciliaten leben. Die Zählung wurde so ausgeführt, dass 0,5 ml Wasser auf mehreren Objektträgergläsern in kleine Tropfen verteilt und die in den einzelnen Tropfen befindlichen Ciliaten unter der Lupe gezählt wurden. Auch diese Zahl bestätigt, dass im Mikrobiotop unter der Flechte sehr viele Protozoen leben. Die Abbauprodukte dieser reichen Fauna haben eine Bedeutung bei der Humusbildung. Im Zusammenhang mit diesen Produkten sind eingehendere Untersuchungen notwendig, um festzustellen, was in den sich von pflanzlichen Organismen ernährenden Protozoen während der Verdauung mit der Zellulose geschieht.

In bezug auf die pulsierenden Vakuolen konnte festgestellt werden, dass ihrer Tätigkeit zufolge im kleinen Wasserraum eine Wasserzirkulation zustande

kommt. Bekannt ist, dass die pulsierende Vakuole als Nierenorgan ausser der Osmoregulation auch eine Ausscheidungsfunktion ausübt. Dieser Umstand hat deswegen eine Bedeutung, weil sich im Biotop, der Tätigkeit entsprechend, Sekrete anhäufen und so die ausgeschiedene Urea den Gesamtstickstoffgehalt des Humus erhöht.

Schliesslich muss darauf hingewiesen werden, dass die sich an den Felsen primär ansiedelnde Algenvegetation von den Flechten der nächsten Sukzession abgelöst wird, diesen folgen die Moose, dann die Farnpflanzen und andere Gewächse höherer Ordnung. Offensichtlich «beanspruchen» die einzelnen Sukzessionen der Flora immer mehr und mehr Nährboden, der stets von der vorhergehenden Pflanzenschicht für sie vorbereitet wird. So gelangen wir zu dem Urbodenbilder, der Flechte.

In felsigen Gegenden ohne Pflanzendecke werden die Auswitterungsprodukte durch das Wasser von ihrer ursprünglichen Stelle weit abgetragen und nur selten kommt es vor, dass sie, so abgesetzt und gelagert, organische Stoffe aufnehmen und zum Nährboden werden. Diese Erscheinung ist am Fuss von kahlen Felsen zu beobachten. In den mit Flechten oder Moosen bedeckten Felsgebieten werden die Auswitterungsprodukte zurückgehalten und gebunden. Die einzelnen Flechtenarten bohren sich, vom Gesteinsmaterial abhängig, mehr oder weniger tief ins Gestein ein. Dies erreichen sie teils durch die Wurzelhaare, teils durch die Lösungswirkung der Pilzfäden. Dazu kommen noch die Lösungswirkung des unter dem Thallus angesammelten und zurückgehaltenen Wassers sowie später die humusbildende Tätigkeit der sich ansiedelnden Mikroorganismen. Unter dem Flechtenlager geht also hauptsächlich ein chemischer Zersetzungsprozess vor sich, und zur selben Zeit bildet sich die Humusschicht dank der Tätigkeit der dort lebenden Organismen unmittelbar. Dies kann in Wäldern, wo aus dem Boden mit Flechten und Moosen bedeckte Felsblöcke hervorragen, sehr gut beobachtet werden. An solchen Stellen sieht man, dass sich am Fuss des Felsblocks der unter dem Flechtenlager ausgewaschene Humus anhäuft und dementsprechend sich auch die Flechten- oder Moosdecke dorthin erstreckt. Die Flechte kann also selbst bei einem einzigen Felsblock eine bedeutende Rolle spielen. Wenn wir nun diese Wirkung der Flechte zu der weiter oben besprochenen Tätigkeit der Mikroorganismen hinzufügen, ist es offensichtlich, dass sich ein bedeutender humusbildender Prozess ausgestaltet.

LITERATUR

1. Baumgärtel, T. (1930) Zur Kultur von Bodenprotozoen. *Arch. Protistenkde.* **70**, 491—496.

2. Boros, J. (1938) Boldogkőváralja környékének kőzettani viszonyai. Gesteinsverhältnisse der Umgebung von Boldogkőváralja. Diss. Szeged. (Ungarisch.)

3. Demeter, K. J. (1936) Neue Methoden zur mikrobiologischen Untersuchung von Boden. Abderhalden's Hdbuch Biol. Arbeitsmeth., **12**/2, 771—887.

4. Fehér, D., Varga, L. (1929) Vizsgálatok az erdőtalaj protozoon faunájáról. Untersuchungen über die Protozoen-Fauna des Waldbodens. *Mat. Term.-tud. Ért.*, **46,** 235—276. (Ungarisch, deutsche Zusammenfassung.)

5. Fehér, D., Varga, L. (1930) Untersuchungen über die Protozoen-Fauna des Waldbodens. *Math. Naturwiss. Ber. Ungarn*, **37,** 81—110.

6. Gelei, J., Horváth, P. (1931) Eine nasse Silber- bzw. Goldmethode für die Herstellung der reizleitenden Elemente bei den Ciliaten. *Z. Wiss. Mikr.*, **48,** 9—29.

7. Gelei, J. (1950) Die *Marynidae* der Sodagewässer in der Nähe von Szeged. *Hidrol. Közlöny*, **30,** 107—119.

8. Gellért, J. (1942) Életegyüttes a fakéreg zöldporos bevonatában. Lebensgemeinschaft in dem grünpulverigen Überzug der Baumrinde. *Acta Sci. Math. Nat. Univ. Kolozsvár*, (8), 1—36. (Ungarisch).

9. Gellért, J. (1950) A legkisebb vízi élettér átmeneti véglényformái. Espéces transitoires d'infusoires du minimum de biotop aquatique. *Hidrol. Közlöny*, **30,** 121—126, 158. (Ungarisch, französische Zusammenfassung.)

10. Gellért, J. (1950) Új *Colpoda* faj ripacszuzmó alól. *Colpoda eurystoma* n. sp. Neue *Colpoda*-Art unter der Flechte von Felsen. *Colpoda eurystoma* n. sp. *Ann. Biol. Univ. Szeged.*, **1,** 313—319. (Ungarisch, deutsche Zusammenfassung.)

11. Gellért, J. (1951) Vándorló lüktetőhólyag az egysejtűek világában. La vacuole poulsatile errant dans le monde des organismes unicellulaires. *Ann. Biol. Univ. Hung.*, **1,** 369—378. (Ungarisch, französische Zusammenfassung.)

12. *Гиляров, М. С.* (1951) Роль почвенных животных в формировании гумусового слоя почвы. *Усп. совр. биол.*, **31,** 161—169.

13. Hazslinszky, F. (1884) A Magyar Birodalom zuzmó-flórája. Die Flechten-Flora Ungarns. Budapest. (Ungarisch.)

14. Horváth, J. (1950) Contributions to studies on soil protozoa of the Ciliata group, with special regard to their adaptation to soil conditions. *Ann. Inst. Biol. Perv. Hung. Tihany.* **19,** 151—162.

15. Johnson, W. H., Larson, E. (1938) Studies on the morphology and life history of *Woodruffia metabolica. Arch. Protistenkde.*, **90,** 383—392.

16. Kahl, A. (1930—35) Wimpertiere oder Ciliata. Jena: Fischer.

17. Mattes, O. (1924) Über Lebensweise, Morphologie und Physiologie von *Amoeba sphaeronucleolus* Greeff und *Amoeba terricla* Greeff *Arch. Protistenkde.*, **47,** 386—412.

18. Pochon, J., Tchan, Y. (1948) Précis de microbiologie du sol. Paris.

19. Telegdy-Kováts, L. (1944) A talajprotozoák kimutatására és számlálására alkalmas módszerek. Zum Nachweis und zur Zählung von Bodenprotozoen geeignete Methoden. In Ballenegger, R., Mados, L.: Talajvizsgálati módszerkönyv. Handbuch der Bodenuntersuchungsmethoden. Budapest. (Ungarisch.)

20. Tobler, F. (1925) Biologie der Flechten. Berlin.

21. Varga, L. (1935) Die Protozoen und ihre Verteilung im Waldboden von Tharand. *Zbl. Bakt.* II., **93,** 128—137.

22. Varga, L. (1935) Daten zur Kenntnis der Protozoenfauna des Waldbodens von Eberswalde. *Zbl. Bakt.* II., **93,** 32—38.

23. Varga, L. (1936) Études sur la fauna des protozoaires de quelques sols du Sahara et des hauts plateaux algériens. *Ann. Inst. Pasteur*, **56,** 101—123.

24. Varga, L. (1936) Az erdőtalajban élő állati véglények (protozoák) életét meghatározó tényezők. Die lebensbestimmenden Faktoren der Protozoen des Waldbodens. Facteurs déterminant la vie des Protozoaires du sol forestier. The life-deciding factors of protozoa of the forest-soil. *Erdészeti Lapok*, **75,** 207—226. (Ungarisch, deutsche, französische und englische Zusammenfassung.)

25. *Вилямс, В. Р.* (1949) Почвоведение. Земледелие с основами почвоведения. Москва.

ИНФУЗОРИИ ГУМУСА, ОБРАЗОВАВШЕГОСЯ ПОД ЛИШАЙНИКОМ PARMELIA SAXATILIS MASS.

Й. ГЕЛЛЕРТ

Под ярусом лишайников, создающих естественный грунт растительных смен, возникающий и накопляющийся тонкий гумусовый слой образует периодичный микробиотоп, в котором нивет богатая микрофауна. Накопляющийся там гумус является первично продуктом самого лишайника, а вторично продуктом взаимодействия живущих в нем микроорганизмов. Несмотря на свою опустошенность, этот биотоп обеспечивает бла-

гоприятные условия для живущей в нем богатой фауны. Такими условиями являются, в первую очередь, связанная под лишайником вода, освобождающийся при ассимиляции живущих в симбиозе с лишайниками водорослей кислород (аэрация биотопа), благоприятная концентрация солей, воникающая вследствие растворяющей способности грибных нитей. При исследовании одних только ресничных, автор обнаружил 32 вида, но наряду с ними живут в биотопе в большом количестве жгутиковые, амебы, коловратки, нематоды и тихоходки.

Фауна ресничных в сильной степени приспособливается к условиям среды, в том числе, в первую очередь, к весьма небольшому водному пространству и к периодичности биотопа. На это указывает то обстоятельство, что ресничные весьма маленького роста, их тело гибкое, они быстро освобождаются от цисты, также скоро инцистируются и в состоянии размножаться в цисте.

Биоценоз биотопа весьма красиво проявляется в пищевой цепи. Всего лишь одна пятая часть найденных ресничных питается бактериальной флорой, бóльшая их часть питается грибами, водорослями или органическим детритом, и наконец, остальная их часть съедает в качестве хищников первых. Эта пищевая цепь обеспечивает биологическое равновесие биотопа.

Гигроскопическо-адгезионное количество воды данного микробиотопа достаточно для активной жизни фауны.

Согласно единству существа со средой, ресничные при вышеупомянутых воздействиях среды также должны воздействовать на свою среду, и следовательно выдвигается вопрос, каким может быть эффект этой взаимосвязи на образование гумуса.

К химическому разложению, происходящему вследствие действия накопляющейся под лишайниками воды и растворяющего действия мицелиальных нитей, присоединяется деятельность микроорганизмов, результатом чего является медленное накопление гумуса.

В результате жизненных процессов простейших, в биотопе накопляются продукты разложения, шлаковые вещества, что, ввиду большого числа видов и особей, безусловно должно иметь значение в образовании гумуса. Автор подсчитал в половинной части одного кубического сантиметра воды в среднем 500 до 600 ресничных. В связи с шлаковым веществом необходимо проведение дальнейших подробных исследований для разъяснения того вопроса, чтó именно происходит с целлюлозой при пищеварении простейших, питающихся растительными организмами и детритом.

Пульсирующие вакуолы при своей высокой частотой опорожнения повышают содержание всего азота в гумусе посредством выделяемой ими мочевины.

Погибшие животные представляют собой наконец составные части гумуса.

Из вышесказанного следует, что фауна ресничных биотопа принимает активное участие в образовании естественного грунта.

THE CILIATES OF THE HUMUS UNDER THE LICHEN PARMELIA SAXATILIS MASS.

J. GELLÉRT

The thin humus stratum developed and accumulated under the lichen layer of the plant successions forming the primeval soil, constitutes a periodical biotope wherein an extremely rich microfauna is living. The humus accumulated in this place is primarily the result of the lichen itself and secondarily of the general activity of the microorganisms living in it. Despite its barrenness the biotope ensures favourable conditions for the rich fauna which lives in it. Such conditions are firstly the water bound under the lichen, the oxygen freed in the course of the assimilation of algae living in symbiosis with the lichen (aeration of the biotope) secondly the favourable salt-concentration due to the dissolving action of water and microspores. The author limiting his investigation to the ciliates found 32 species, but besides them Flagellata, Amoeba, Rotatoria, Nematoda and Tardigrata are also present in the biotope in large numbers. The ciliate fauna adapts itself considerably to the environmental conditions, thus in the first place to the extremely small water-space and to the periodicity of the biotope. This is shown by the fact that they are in general very small-sized, their body is flexible, they encyst and burst their cysts rapidly and are able to propagate in the cyst.

The unity of the biotope manifests itself clearly in the nourishment-chain. Only a fifth part of the ciliates found destroys the bacterium flora, the majority of them subsist on fungi and algae or consumes organic detritus, while another part is predatory and destroys the former. This nourishment-chain guarantees the biological equilibrium of the biotope.

The hygroscopic-adhesive water amount of this microbiotope is sufficient for the active life of the fauna.

Considering that the living being and its environment, are forming a unity, the ciliates too, along with the above environmental factors should act on the environment, and thus the question arises, how this interrelation acts on humus-formation.

The chemical disintegration occurring in consequence of the dissolving effect of the water accumulated under the lichens and of the microspores, together with the activity of microorganisms results in the slow accumulation of humus.

As a consequence of the metabolic processes of protozoa, decomposition products, and fecal matter accumulate in the biotope, and this fact — considering the large number of species and individuals — undoubtedly plays an important role in humus formation. The author counted 500 to 600 ciliates in half a cubic centimetre of culture water. As to decomposition products, further exhaustive studies are needed in order to ascertain what happens in the course of digestion to the cellulose in the protozoa subsisting on vegetal organism and detritus.

The pulsating vacuoles as renal organs increase the nitrogen content of the humus through the urea secreted by them.

Ultimately the destroyed animals appear as constituent parts of the humus.

From the above-mentioned follows that the ciliates of the biotope contribute actively to the formation of the primeval soil.

JÓZSEF GELLÉRT, Tihany, Biologia, Ungarn.

ABOUT THE PHYSIOLOGY OF PROTOPLASMIC MOVEMENTS

N. I. GIMESI and B. I. POZSÁR

CIENTIFIC LABORATORY OF THE UNIVERSITY BOTANICAL GARDEN, BUDAPEST (DIRECTOR: N. I. GIMESI)

(Received: August 30, 1954)

Summary

1. According to our model experiments concerning albumen, we can draw the conclusion that amino acids stimulate protoplasmic streaming by way of decreasing cytoplasmic viscosity.

2. Vacuum infiltrated papain and other proteolytic enzymes are causing an increase in velocity by raising the free amino acid level. The in situ activation of the papain by ascorbic acid, glutathion and cysteine have also confirmed our conception about the role of α-amino acids in protoplasmic streaming.

3. The influence of α-amino acids is antagonised primarily by bi- and multivalent cations, but the role of potassium is also important in this respect.

4. According to our inhibition experiments with sodium fluoride and potassium cyanide we have to keep in mind that at least two cases of aerobic respiratory systems are active in the process of protoplasmic streaming; the one being cyanide sensible, the other cyanide insensible.

5. The gel constitution of the vacuole becomes reversibly coagulated under the influence of potassium permanganate treatment, together with the simultaneous appearance of the phenomena of movement.

6. We succeeded in demonstrating by histochemical methods that the cytoplasmic conglomerate, which got gelificated in the systrophe, contains more potassium, than the plasm in sol condition elsewhere.

7. Actually gelificated cell surfaces, films, minute membranes do exist under the membranes (plasmoderm, tonoplast) inside the plasma also and they are presumably capable of accumulating ions and organic compounds of small molecular weight. According to our opinion it is through the active ion accumulation of the gelificated cell membranes, i. e. indirectly, that the energy producing processes of the respiratory systems are connected with the protoplasmic streaming. The ion absorbing activity of the membranes creates and maintains concentration differences which are producing an action current, and streaming of the optimally solificated protoplasma sets in order to compensate the concentration differences.

Introduction

Primarily our investigations refer to the protoplasmic movements of the higher plants, which are independent of locomotion. We also mention the amoeboid type of movement, because this had been linked up by numerous authors with the vivid movement of cell contents during cytoplasmic division (LETTRÉ [45], GOLDACRE and LORCH [32]). This symptom seems to be of special interest, having also been observed in cytoplasms without nuclei (KÜSTER [42], LEPESHKIN [44]).

Among the conditions of protoplasmic streaming we were mainly concerned with such factors governing sol-gel conditions, which supposedly are the natura

gelificators, solificators respectively, of the cytoplasm. The relationship between protoplasmic movements and respiratory processes is unanimously accepted on the basis of the energy claim of this phenomenon. The role of the respiratory system in this process is, however still problematic. Our investigations concerning the mechanism of protoplasmic streaming were partly directed towards the latter question, partly to the problem whether of elucidating the processes in which the discharged chemical energy was consumed primarily and of clearing up how it got realised directly in the phenomenon of movement.

For the phenomena of protoplasmic movements we have generally used the expression of protoplasmic streaming on the basis of the fact that these types of movement are not systematized by numerous authors (KÜSTER [42], WEEVERS [74], BOURNE [11], ROBERTIS, NOWINSKI and SAEZ [57], etc.), because the whole cytoplasm is only most rarely taking part in the movement of cells of one single vacuole, and because rotation may be considered as a special case of circulation. The movement in the rotating protoplasmic fibre is always a one-way movement, but in the circulation of cells with more vacuoles there can be observed two movements of opposite direction (STRUGGER [63], GIMESI [30]), which are separated by actually immobile plasmic gel, (BARG [2], KÜSTER [42], STRUGGER [63]). In such circulating cytoplasm with many vacuoles the position of the streaming protoplasmic fibres is changing in the space of the cell (KURSANOV [41], GIMESI [30]). Owing to this latter fact we may conclude that besides the cytoplasm the vacuoles are also concerned in the locomotion of the protoplasmic fibres. Generalizing this question, it could be asked, to what an extent the vacuoles do take part in the protoplasmic streaming. It has to be mentioned that STRUGGER [63] is dividing the protoplasmic movements into two groups : the originally existing primary types of streaming and the secondary ones, which appeare only as a result of outside influences. FITTING's [19—27] division into groups of the secondary protoplasmic streaming is based on the outside factors (photodinesis and chemodinesis). When interpreting the mechanism of streaming, authors attribute considerable importance to the adequate sol-gel conditions of the protoplasm (SEIFRIZ [59—60], FREY—WYSSLING [28]). The reversibility of the change of conditons of the sol-gel in the protoplasm generally depends on the physiological condition and activity of the cell, just as on the physical (light, heat, pH, oxydation-reduction potential, thixotropy, etc.) and chemical (enzymes, activators) effect. My previous investigations (GIMESI [30]) refer to the cell-physiological relations of the phenomenon of thixotropy. According to these investigations, mechanical reasons (shaking, stirring) cause solification, and gelification gets restored when outside influences stop to act, and this process may be repeated continually. Studies on dichroism (FREY—WYSSLING [29]) and measurements (PFEIFFER [54, 55]) point to a special change of the plasmic structure (LEHMANN [43], SEIFRIZ [60]). PFEIFFER has perceived the changed

dichroism (Δk) of the cells as being the effect of the various concentrations of 2—4 dinitrophenol [55].

Viscosity and changes in the viscosity of the cytoplasm also become significant in the movements. The velocity of streaming is different at certain regions of the streaming protoplasm. It may be supposed therefore that there is a close connection between the various viscosities of the cytoplasm and the velocity of its streaming. According to the investigations of GOLDACRE and LORCH [32] we may explain the differences in cytoplasmic viscosity by the presence of materials which are causing solification (e. g. heparin). Besides these artificially infused physiologically active materials the α-amino acids, mainly histidin and some of its derivatives, which were used by FITTING in his experiments, are also acting supposedly, by way of viscosity. This our supposition is justified by the facts too which indicate that light (VIRGIN [69, 70, 71]), heat (EWART [17]) and the natural and artificial auxins (SWEENEY [66] and THIMANN [67]) are capable of acting on the velocity of the protoplasmic streaming by way of their viscosity-decreasing character.

Our investigations were directed towards elucidating the viscosity forming effects of α-amino acids. We presumed that the growth-stimulating amino-acids stimulating the velocity of movement take part in the mechanism of streaming through the solification of the cytoplasm. In case the results of our experiments should verify our supposition, stimulation could be brought in connection with the activity of the papain, by way of its in situ stimulating and inhibiting effects. We tried to study the natural gelificators of the cytoplasm too the action of these gelificators could be considered as being the antagonistic process of the solificating effect of the α-amino acids.

The problem of the energetics of protoplasmic movements has been studied by numerous authors. In recent literature dealing with this problem the opinions are unanimous about the energy of the streaming processes being granted by respiratory processes. BEIKIRCH's [3] investigations point out the importance of oxygen, the presence of which improves, its absence inhibits the velocity of movement. Oxygen may get into the cells by way of diffusion and assimilation. WENT's [73], HILLE's [35], and ZURZYCKI's [75] researches point to the enzymatic relationship of the protoplasmic movements. These investigators have found a direct relation between temperature and velocity of movement in various plants up to 40 to 46° C. The velocity forming effects of sudden changes of temperature are especially of great interest (ZURZYCKY [75]). The evidence of VAN'T HOFF's law with regard to protoplasmic streaming is regarded as verified by BOTTELIER [9,10], in the relationship between temperature and velocity and by the determination of the $Q_{10} = 1{,}8$ value. In their rather important experiments with amoeba GOLDACRE and LORCH [32] have observed the ATP causing an increase in velocity, when being infused into the cytoplasm by a micromanipulator; on the basis of this

fact they have drawn the conclusion that a relationship exists between the respiratory processes. In accordance with THIMANN [67] and SWEENEY [66] we may not speak about a special respiration process of protoplasmic streaming. OLSON [52] and DU BUY [15, 16] presume that the two respiratory systems release energy for the streaming processes. They have observed a 50% decrease in the streaming velocity and a 61% decrease in the respiratory intensity at *Avena* coleoptilum, treated with 0,01 M hydrogen cyanide. On the basis of these and other experimental results, two systems are supposed to be effective : the one being cyanide-sensitive, the other cyanide-indifferent. In the course of our investigations we were dealing with both presumable respiratory systems. The in situ activity of the enzymes was studied by symptoms of poisoning. Furthermore our attention was extended to the problem, at which point the energy producing processes of the respiratory system did join into the mechanism of protoplasmic streaming.

The change in the hydratation of the cytoplasm acts only through the intensity of enzymatic activity, because the movement of the plasmolysed cell content can be observed too (KÜSTER [42]). When interpreting the gelificating role of low temperature, the change of the structure of the free water may still be mentioned (CRAFTS, CURRIER and STOCKING [14]).

Finally we were dealing with the connection between the protoplasmic movement and the processes of the translocation of material.

Material and methods

Primarily leaves of *Helodea canadensis* were used for our experiments. The mean value for the measurements of velocity (μ/sec.) has been stated by STRUGGER's [63] statistical method. Scatters of measurement (δ) and the mean error of the mean value (m) were presented in every case. At certain occasions we have used the epidermis of *Allium Cepa* L. also which has a unicellular layer. Both experimental materials agree in having a single vacuole in their cells of big seize.

On the basis of FITTING's results, the effect of the α-amino acids (histidene, glycoccoll, phenylalanin) on viscosity was studied on albumen model. In our experiments the albumen has been filtered, therefore our observations refer only to the sol-forming materials. The change in viscosity has been measured by HÖPPLER's apparatus. Besides examining the 0,02% solutions of the α-amino acids, the effect of the different electrolytes 0,02 M was studied too. The role of the α-amino acids was brought in connection with the hydrolytic activity of the albumen-catabolising enzymes, which are active in the cytoplasm. The 0,02% aqueous solution of papain and pepsin, further the digestive sap of insectivorous plants *(Nepenthes)* were vacuum infiltered into tissues of *Helodea canadensis* (KURSANOV [40], BELOSERSKY and PROSKURIAKOV [6], MICHLIN and PSHENOVA [49]) and the increase in velocity was evaluated by statistical methods, after one hour has passed. According to results obtained by BERSIN [7], SUMNER and MYRBÄCH [64], BONNER [8], BRAUNSTEIN and SHEMJAKIN [12], etc. it is known that papain gets activated by the effect of reducing materials, when disulphide groups are transformed into sulphhydril, at adequate oxydation-reduction potential (+ 300 mV, at 6,8 pH). According to data obtained by PROSKURIAKOV and MOSOLOVA [56], plant tissues contain a considerable quantity of glutathion (a to 3 mg/g). According to these data we wanted to provoke in situ papain activation by 0,02% ascorbic acid, glutathion and cystein. Activation was registered by measuring velocity. In order to be sure whether in situ papain activation had really taken place, we led the free amino acid level. The relative amino acid content was measured by SAIFER's [58] photometric method. We also had studied the influence of oxydating materials (0,001 M potassium permanganate) and that of reducing ones (0,01 M ascorbic acid) on the velocity of protoplasmic streaming, with regard to the oxydation-reduction potencial of the cell, by applying these materials separately and in succession.

The velocity of the protoplasmic streaming in leaves of Helodea canadensis has been examined, when the leaves were kept during one hour in solutions of different concentrations of potassium cyanide and sodium fluoride. We expected to be able to distinguish the details of the mechanism by examining the phenomena of inhibition which depend on concentration.

The vacuole-content has been studied not only by the above mentioned oxydating and reducating materials, but by vital staining too. The potassium content of the protoplasmic conglomerate or systrophe, reported by KÜSTER [42], was demonstrated by us by the histochemical method (dipicrylamine, sodium cobaltinitrite) of CARERE-COMES [13], GLICK [31]. At the evaluation of our observations we have used the microcinematographic method too (KUHL [39] and FAASCH [18]).

Results

In our experiments the α-amino acid decreased the viscosity of the albumen (Table I).

Table I

Gelificating influence of α-amino acids on albumen

Solutions	Mean value of relative viscosity	δ scatter of measurement	m mean value of mean error
0,02% histidine diluted in albumen	0,929	± 0,0033	0,0015
0,02% glycocoll diluted in albumen	0,945	± 0,0026	0,0011
0,02% phenylalanine diluted in albumen	0,979	± 0,0041	0,0018

The α-amino acids decrease the viscosity of albumen at 0,951 mean value. The level of the α-amino acids undoubtedly can be related to the hydrolysis-synthesis ratio of the proteolytic enzymes. The enzymes which got into the tissues by way of vacuum infiltration, have caused there — apart from the shattering effect of the method — an increase in velocity (Table II).

Table II

Influence of vacuum infiltrated proteolytic enzymes on the streaming of the protoplasm of Helodea canadensis

Enzymes	Mean value of velocity (μ/sec)	δ scatter of measurement	m mean error of mean value
Water	9,69	± 4,6	1,0
0,02% papain	14,11	± 5,1	2,3
0,02% pepsin	20,68	± 3,2	1,4
Digestive sap of *Nepenthes*	17,08	± 3,8	1,7

With the help of reducing materials (ascorbic acid, glutathion, cystein) we succeeded in calling forth a stimulation of the protoplasmic streaming, which refers to the process in which the papain becomes activated in situ (Table III).

Table III

In situ activation of papain in leaves of Helodea canadensis

Activators	Mean value of velocity (μ/sec)	δ scatter of measurement	m mean error of mean value
Water	21,81	± 6,4	0,9
0,02% ascorbic acid	31,37	± 4,0	1,8
Glutathion	26,91	± 3,6	1,7
Cysteine	25,39	± 4,2	1,8

The activating effect produced ou proteolytic enzymes by the reducing materials applied was verified by measuring the amino acid content. Influenced by vacuum infiltrated papain and glutathion, the free amino acid content has increased considerably after one hour (Table IV).

Table IV

The relative free acid content in the one cell layered epidermis of Allium Cepa, influenced by vacuum infiltrated water, papain and glutathion

Vacuum infiltrated material	Mean value of extinction	δ scatter of measurements
Water	1,155	± 0,01
0,02% papain	1,595	± 0,01
0,02% glutathion	2,350	± 0,10

The velocity of protoplasmic streaming was strikingly increased by employing oxydating and reducing materials successively (Table V).

Table V

Influence of oxydating and reducing materials on the velocity of protoplasmic streaming in Helodea canadensis

Solutions	Mean value of velocity (μ/sec)	δ scatter of measurement	m mean error of mean value
Water	21,81	± 6,4	0,9
In 0,001 M potassium permanganate after one hour	27,11	± 3,5	1,5
In 0,001 M ascorbic acid, after one hour	31,37	± 4,1	1,9
In 0,001 potassium permanganate, during one hour, then in 0,01 M ascorbic acid, after one hour	37,79	± 2,9	1,3

Having known the materials and enzymatic activities which call forth natural gelification, we attempted to disclose the effect of the materials which gelificate the cytoplasm. The electrolytes of small molecular weight could be regarded as antagonistic processes of the solificating effect of the α-amino acids. The earth metals and the salts of the earth metals are especially worth of special attention.

We examined the influence of some electrolytes on the velocity of the protoplasmic streaming. Generally even the salts of the alkali metals inhibit remarkably the velocity of protoplasmic streaming (Table VI).

Table VI

Influence of anorganic compounds on velocity of protoplasmic streaming of Helodea canadensis

Electrolytes	Velocity (μ/sec) in mean value	δ scatter of measurements	m mean error of mean value
Water	21,81	$\pm$ 6,4	0,9
0,02 M KNO_3	16,10	$\pm$ 4,1	1,8
0,02 M KCl	15,90	$\pm$ 5,2	2,3
0,02 M K_2SO_4	17,97	$\pm$ 3,8	1,7
0,02 M $Ca(NO_3)_2$	13,25	$\pm$ 4,2	1,9
0,02 M $MgSO_4$	13,75	$\pm$ 3,0	1,3
0,02 M $AlCl_3$	13,33	$\pm$ 5,3	2,4

The velocity inhibiting influence of the electrolytes being known, there arises the question of examining their role concerning viscosity. We examined the influence on viscosity of the above mentioned electrolytes on an albumen model. The values obtained do not explain the decreasing influence of potassium salts on the velocity of streaming, although — contrarily to the data reported in literature — they have somewhat increased the viscosity of the filtered albumen solution. However, it has to be taken into consideration that the solificating character of the potassium was studied by STRUGGER [63] an other with regard to the living cytoplasm, in which — as it is known — both the sol- and the gel-content are present. On the other hand, in our experiments we have only dealt with the sol content of albumin (Table VII).

According to the experimental results it may be definitely stated that the viscosity decreasing influence of the bi- and multivalent cations is much greater, than that of the potassium compounds. The concentration of the potassium being essentially greater in the plant ash, than that of the multivalent metals, we attempted the multivalent antagonism of albumen solification of the α-amino acids primarily by potassium salts. According to the results concerning the albumen, the gelificating character of the potassium compounds is stronger than the solification of the α-amino acids (Table VIII).

Table VII

Gelificating influence of anorganic compounds on albumen

Electrolytes	Relative viscosity in mean value	δ scatter of measurements	m mean error of mean value
0,02 M KNO_3 dissolved in albumen	1,064	$\pm$ 0,0032	0,0014
0,02 M KCl dissolved in albumen	1,053	$\pm$ 0,0024	0,0010
0,02 M K_2SO_4 dissolved in albumen . .	1,050	$\pm$ 0,0029	0,0013
0,02 M $Ca(NO_3)_2$ dissolved in albumen	1,112	$\pm$ 0,0035	0,0015
0,02 M $MgSO_4$ dissolved in albumen . . .	1,104	$\pm$ 0,0042	0,0019
0,02 M $AlCl_3$ dissolved in albumen . . .	1,164	$\pm$ 0,0037	0,0016

Table VIII

The influence on albumen of potassium salts, which equalize solification of α-amino acids

Solutions	Relative viscosity in mean value	δ scatter of measurements	m mean error of mean value
0,02% histidin dissolved in albumen . .	0,929	$\pm$ 0,0033	0,0015
0,02 N KNO_3 dissolved in albumen . . .	1,064	$\pm$ 0,0032	0,0014
0,02% histidine and 0,02 N KNO_3 dissolved in albumen . . .	1,014	$\pm$ 0,0040	0,0018
0,02% glycocoll dissolved in albumen .	0,945	$\pm$ 0,0026	0,0011
0,02 N KCl dissolved in albumen	1,053	$\pm$ 0,0024	0,0010
0,02% glycocoll and 0,02 N KCl dissolved in albumen	1,018	$\pm$ 0,0029	0,0013

The importance of the presence of oxygen from the point of view of the mechanism of protoplasmic streaming was verfied by numerous experiments. Oxygen may get into the living cell either by way of diffusion, or it appears in it in the course of assimilation. On the basis of these considerations, the idea may arise that the biocatalitic activity of the molar oxygen of the air can be made responsible for the liberation of energy. From the inhibition phenomena of the potassium cyanide it would appear that — during the process iron and copper containing enzymes are becoming inactivated — there is a possibility for other, non cyanide-sensible systems to remain active (Table IX).

The inhibition of sodium fluoride is much more characteristic than that of potassium cyanide, as at certain higher concentrations of the former a definite inhibition is to be seen, while at lower concentrations a stimulation may be observed. The measure of the velocity inhibiting-stimulating influence depending on the sodium fluoride concentration is shown in Table X.

Table IX

Inhibition of potassium cyanide on velocity of protoplasmic streaming in Helodea canadensis

N KCN	Velocity (μ/sec)	δ scatter of measurements	m mean error of mean value
Water	21,81	± 6,4	0,9
0,0001	19,35	± 4,1	1,8
0,001	16,55	± 3,7	1,6
0,002	15,62	± 2,9	1,3
0,005	16,07	± 5,8	2,6
0,01	14,81	± 3,2	1,4
0,02	14,13	± 3,9	1,7
0,05	—	—	—

Table X

Inhibition of sodium fluoride on velocity of protoplasmic streaming in Helodea canadensis

N NaF	Velocity (μ/sec)	δ scatter of measurements	m mean erorr of mean value
Water	21,81	± 6,4	0,9
0,0001	29,40	± 4,1	1,8
0,0002	25,15	± 5,7	2,4
0,0005	22,96	± 3,9	1,7
0,001	18,30	± 4,7	2,1
0,002	16,14	± 2,5	1,1
0,05	12,74	± 4,0	1,8
0,01	11,03	± 3,1	1,4
0,02	—	—	—

Fig. 1 presents the inhibiting influence of potassium cyanide and sodium fluoride on the velocity of the protoplasmic streaming.

Among the cytological observations dealing with the protoplasmic streaming the phenomenon of the systrophe could be of special value (Fig. 2). This conglomeration of cytoplasm, which contains a relatively great amount of plastids, protrudes considerably into the vacuole, and owing to the streaming of the plasmic tube it gets carried foreward. The chloroplasts which are placed in the extension of the plasm — which extension has the shape of a peninsula — do not change their position with relation to each other ; accordingly, the conclusion seems to be justified that the cytoplasm keeping the mtogether is considerably gelified. When moving, the systrophe may roll forward like a ball, its

inner content, however, remaining fixed. The systrophe gets dissolved by the influence of solificating substances (ascorbic acid, heparine, heteroauxine,

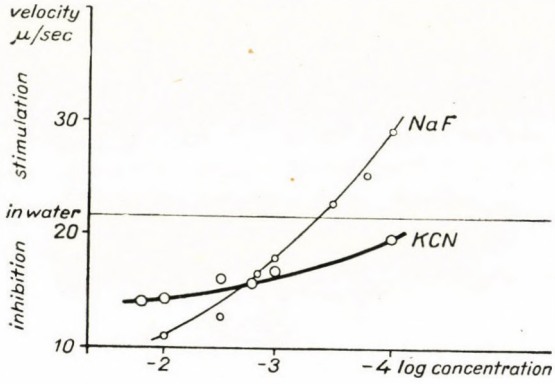


Fig 1. Inhibiting effect of sodium fluoride and potassium cyanide on velocity of protoplasmic streaming

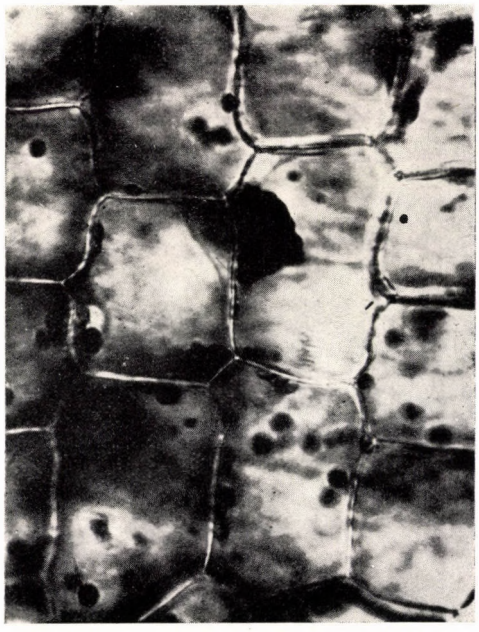


Fig. 2. Systrophe caused by the effect of 0,05 M sucrose. Gelificated conglomerate of schloroplastis in cell of *Helodea canadensis*

etc.). The systrophe sometimes occurs in untreated tissues too, but it easily can be provoked by hypotonic (0, 05 to 0,15 M) sugar solutions. By histochemical methods we succeeded to prove in the systrophe that the gelificated conglomerate of the cytoplasm contains more potassium than the solificated one.

We shortly refer to our observation according to which cyanin solution of small concentration caused considerable solification in the gelificated cytoplasm.

From a certain point of view the mechanism of the vacuole may also be significant when the phenomena of protoplasmic streaming are studied. The vacuoles are of definite structure, which fact was verified by vital staining. It is often to be observed, even without staining that one part of the vacuole is

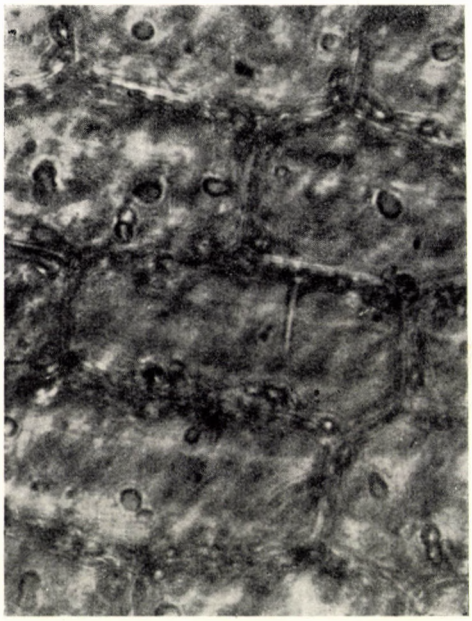


Fig. 3. Streaming protoplasmic fibre in immobile cell of *Helodea canadensis*

gelificated. Generally it cannot be observed that in cells with one vacuole the protoplasmic streaming is appearing in the content of the vacuole. In cells with many vacuoles it is easily possible to observe the change of the plasm fibres, (plasm bridges), which are moving in two opposite directions in the cell space (Fig. 3). In this latter phenomenon naturally the form of the vacuole is permanently changing too. And in spite of this fact the displacement of the vacuole is not to be observed.

In the cells of the leaves of *Helodea canadensis* — under the influence of 10^{-2} and 10^{-3} M potassium permanganate, at 37°C, after 1 to 2 weeks — the characteristic cell content of the vacuole appears in many cells, in form of irregularly chaped accumulations of granulated structure, and it is to be clearly seen, how it participates in the movement of streaming (Fig. 4). This movement of the vacuole content becomes lively under the influence of ascorbic acid.

Fig. 4. Dehydrated and shrunk vacuole content in cell of *Helodea canadensis*, with streaming protoplasm along the longitudinal cell walls

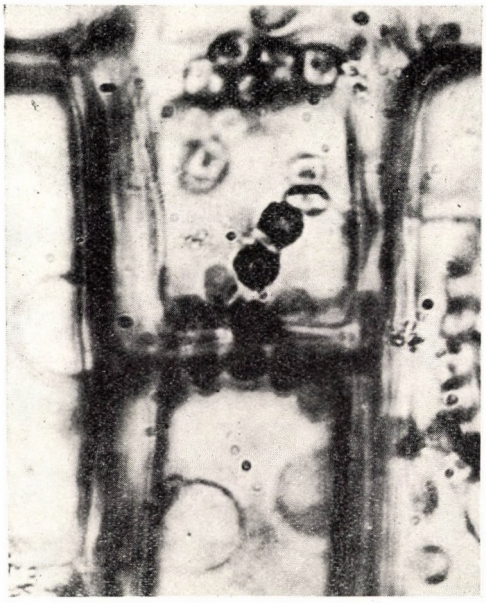


Fig. 5. Secondary vacuolisation in cell of *Helodea canadensis*

In the course of natural aquatic cultivations the gelificated accumulation of the vacuole in certain cases may get vacuolised again secondarily, and, consequently, 3 to 4 smaller vacuoles get formed (Fig. 5). It is often to be observed in these cells that the aggregations of vacuole inside the protoplasm are moving. The plasm and the vacuoles are separated strictly in every case, supposedly on account of the differences in viscosity.

Discussion

As to the understanding of the phenomena of the protoplasmic movements, the problem of the streaming mechanism may be discussed in two parts. The first problem is the sol-gel condition of the cytoplasm, from the physicol-chemical point of view as well as from the point of view of celloid chemistry having special regard to the change in the balance of solification-gelification, the change of condition respectively. The second problem is the beginning of the movement of the adequately solificated protoplasm, and the persistence of the movement, primarily with regard to energetics.

It is namely to be supposed that only the adequately solificated plasmic cell is able to move, this condition being called forth by the influence of the various physiologically active materials. According to our experiments, the α-amino acids are constituting a rather important group of these materials, as well as the activators regulating the hydrolytic functions of papaine. The auxins too may be considered as such natural agents.

With regard to cytoplasmic movement, physical factors may also be significant in the development of an optimal viscosity, primarily light and heat.

According to our conception the solificating effect of the α-amino acids is antagonised before all by anorganic salts of small molecular weight, but the potassium too has to be considered as rather important from this point of view. By centrifugal method it can be definitely established that 0,02 M KNO_3 decrease the viscosity of the living cytoplasm (STRUGGER [63]). According to our data concerning filtered albumen, KNO_3 increases the viscosity of the sol component in a small degree, even in presence of α-amino acids of solificating character. The inhibition of the protoplasmic streaming of the potassium salts is much greater than would be expected on the basis of the model experiment. This observation seems to give rise to the conclusion that we are in presence of an indirect effect. The incongruity observed by us when confronting our own data with the data reported in literature about the effect of potassium and of the multivalent cations on viscosity, could be brought in connection with the data of SIMONIS [62] obtained during his researches on resistance to drought. Simonis too has observed an effect opposite to that, which would have been expected with respect to potassium. So much, however, can be definitely stated,

that the viscosity increasing effect of the be- and multivalent cations is much greater than that of potassium. The electron-microscopic photographs of BAIRATI and LEHMANN [1] also demonstrate that the albumen gelificating influence of the salts of alkali metals is remarkably greater than that of the alkali meta-compounds. We have to mention that, in the reversibility of the sol-gel condition and of viscosity, great significance is to be attributed to the trace elements too (NATHANSON [50]).

Our assumption, that there is a close relationship between the activity of papain and the protoplasmic streaming, is confirmed by the positive results obtained concerning the stimulating effect, exerted on the streaming velocity by the papain (pepsin, natural plant digestive sap) vacuum infiltered into the tissues as well as by the results obtained during the process in which papain became activated in situ and further by the results. This supposition is also confirmed by our data arrived at when measuring the relative amino acid content ; according to the latter data, the hydrolysing activity of papain is indirectly effective, in consequence of the raising of the level of the free amino acid. On the basis of these considerations it may be supposed that a decrease of the free amino acid is capable of causing gelification. The latter phenomenon can partly be explained by the synthesizing activity of papain, and partly by the biocatalytic oxydation of the amino acids (PARSIN and GORIUCHINA [53], MICHLIN and BRONOVICKAIA [47], KRETOVICH and DROZDOVA [38], GORIUCHINA [33], etc.). We think we are justified in explaining the process in which the oxydating and reducing materials become independently and successively activated by the development of the optimal oxydation-reduction potential of papain. Our conception is confirmed by the data of LWOFF [46], who has observed an optimum (E_h) oxydation-reduction 200 to 300 mV in pure cultured amoebae when the propagation was stimulated.

The respiratory systems constitute an important group of the limiting factors (excepting heat, viscosity, the presence of materials causing decrease [α-amino acids] and increase [cations] in viscosity and excepting also oxydation-reduction potential), the respiratory systems can be made responsible for liberating chemical energy.

Protoplasmic streaming is at any rate joiend to enzymatic activities, because the increase in its velocity is in direct ratio to the rise of temperature (BELEHRADEK [4, 5]). It was possible to verify validity of VAN'T HOFF's law in old cells only — at least in a significant manner. Although we cannot speak about special streaming respiration nevertheless, on the basis of the oxygen claim of the process, it may be asserted for sure that the energy is afforded by the molar oxygen activating processes of the aerobe respiration. Our potassium cyanide inhibition experiments point to the fact, that when enzymatic systems containing iron and copper are eliminated, cyanide insensible systems are to be found. The parallel activity of both systems is also to be supposed. Probably the

cyanide insensible enzymatic system is based on the activity of flavoprotein (MICHLIN and KOLESNIKOV [48]).

We wished to answer the question also, where the energy producing processes of the respiratory systems did join in the streaming mechanism. At the physical models the movement has stopped as soon as the differences (heat, concentration) were equalised. Accordingly, energy is needed for the establishment and maintenance of the differences. We would suppose that the movement of the optimally solificated plasm might serve as an equalisation of the differrences in concentration (organic compounds of small molecular weight, ions), which exist in the cell space too. By the histochemical localisation of the potassium we have been able to establish that its distribution is not regular in the cell space and, further that the gelificated regions contain more potassium. These data seem to suggest that the different concentrations of the ions in every cell region induce current (UMRATH [68], ISAWESTIN [36], IWAMURA [37]). Our present knowledge seems to justify the supposition that the activity and the mechanism of the cell membranes are responsible for the unequal distribution of the ions and of the organic compounds. It is possible, that in the plasma there are actually gelificated membranes (SISAKIAN [65]) even besides the plasmoderma and the tonoplast, and through the ion absorption of these a difference arises in the concentration. The protoplasmic streaming begins to set in, in order to balance the concentration difference, which is maintained by the ion accumulation of the cell membranes. On the basis of these considerations, our opinion is that the energy liberating processes of respiration join in the mechanism of the phenomena of protoplasmic movement by way of the process in which actually gelificated membranes do absorb ions and organic compounds of small molecular weight.

Following comments are to be added to our cytological observations. The systrophe is formed as a result of the gelification of the cytoplasm, in which process possibly the peristrome encircling the plastids, described by GUILLIERMOND and ATKINSON [34] may also take part. The systrophe that advances in the protoplasmic streaming, may reach deeply into the vacuole and accordingly it changes the mechanism of the latter. It is known first of all by WEBER's [72] investigations carried out with vital staining, that the vacuole is containing numerous small lagunes, which are strictly separated from each other by a more or less gelificated albumen layer. The vivid Brownian movement of the granules filled with liquid seems to lead us to the conclusion that the viscosity of the environment is low. We suggest to explain the development of the gelificated vacuole — which has condensed to a single granule under the influence of potassium permanganate — through the reversible change of the mechanism or of the activity of the tonoplastre. The observed movement of the vacuole content is also understandable in this way. In order to explain the mechanism of protoplasmic streaming, the idea of a rhythmical contraction-relaxation is

suggested by SEIFRIZ [60], BOURNE [11] and SHALP [61]. According to the opinion of these authors, the power bringing about the movement originates from the contraction i. e. from the shortening which follows the gelification of the membrane. When the membrane gets solificated, the movement does not take place. This interpretation refers to the phenomena of movements of the plasmodia and pseudopodia. The two oppositely directed streamings, however, which are to be observed in the plasmic fibre of the multi-vacuoled cell, are inexplicable on the basis of this model of movement, and the movement of the gelificated accumulation to be seen in the space of the vacuole, cannot be explained either. It seems important to refer to the observation according to which an immobile, gelificated layer exists in the «circulating» plasmic fibre, inside the plasm moving away in two directions (Strugger [63]). According to our conception, the activity of the gelificated membranes, which activity maintains the differences in concentration, would account for the mechanism of protoplasmic streaming. A change — effected under the influence of potassium permanganate — in the structure or in the functioning of the tonoplast permits of the transmission of the phenomenon of streaming. This change is either conceivable as an effect of GOLDACRE and LORCH's [32] heparine treatment, i. e. as a solification, or as a coagulation of the tonoplast, which coagulates together with the albumen content of the vacuole ; this process is accompanied by dehydratation.

The stimulating influence of the cyanine and its derivatives may be explained in our opinion by the phenomenon of photosensibilisation. On the basis of this fact we have to rekon with the possibility that the energy of light proves effectual through the natural sensibilisators contained in the tissues. In the immobile cytoplasm under the influence of light there is to be observed a disorderly waving-streaming («Glitschbewegung») without orientation ; this waving-streaming later gets stabilized in a one-way movement. This also points to the fact that the direction of the movement — considered statistically — makes 50—50% because the direction of the streaming gets actualized as a result of the solification of the plasm. This is confirmed by KÜSTER's [42] data too, who had observed contrarily directed movements in the plasmolysed cell.

In recent literature numerous authors consider it as natural to raise the question about the connection between protoplasmic streaming and the translocation of matter. In the sieve tubes the protoplasmic movement is to be observed very well. In connection with the bast elements we have to accentuate first of all the mechanism and the activity of the plasmodesm. By OKNINA's [51] observation we learnt to know that the metabolic processes of the plasmodesm are remarkably active during the growth period of the organism. This observation justifies that the velocity of the translocation of matter in the sieve tubes is considerable. The plasmic fibres which pass through the perforations,

establish a direct contact between some cells. This fact is significant with regard to the translocation of matter and is in contrast to the influence of the lipoid membranes which are able to maintain a concentration difference.

LITERATURE

1. Bairati, A., Lehmann, F. E. (1951) Über die Feinstruktur des Hyaloplasmas von *Amoeba proteus*. *Rev. Suisse. Zool.*, **58**, 443—449.

2. Barg, T. (1943) Über die Indifferenzstreifen der Characeen. *Protoplasma*, **37**, 293—299.

3. Beikirch, H. (1925) Die Abhängigkeit der Protoplasma Strömung von Licht und Temperatur und ihre Bedingtheit durch andere Faktoren. *Bot. Arch.*, **12**, 389—445.

4. Belehradek, J. (1929) Sur la signification des coefficients de temperature. *Protoplasma*, **7**, 232—255.

5. Belehradek, J. (1935) Temperature and living matter. Berlin : Borntraeger.

6. *Белозерский, А. Н., Проскуряков, Н. И.* (1951) Практическое руководство по биохимии растений. Москва : Советская Наука.

7. Bersin, Th. (1951) Kurzes Lehrbuch der Enzymologie. Leipzig : Akademische Verlaggesellschaft.

8. Bonner, J. (1950) Plant biochemistry. New York : Academic Press.

9. Bottelier, H. P. (1934) Über den Einfluss äusserer Faktoren auf die Protoplasmaströmung in der *Avena* coleoptile. *Rec. trav. bot. neerl.*, **31**, 374—415.

10. Bottelier H. P. (1935) Oxygen as limiting factor of the protoplasmatic streaming in *Avena* coleoptiles of different ages. *Rec. trav. bot. neerl.*, **32**, 278—292.

11. Bourne, G. H. (19) Cytology and cell physiology. Oxford : Clarendon.

12. *Браунштейн, А. Е., Шемякин, М. М.*, (1952) Теория процессов аминокислотного обмена катализируемых пиридоксалевыми энзимами. *Докл. Акад. Наук СССР*. **85**, 1115—1118.

13. Carera-Comes, O. (1938) Neue Methoden zum histochemischen Nachweis des Kaliums und zur elektiven Färbung der kalireichen Gewebe. *Z. wiss. Mikroskop.*, **55**, 1—7.

14. Crafts, A. S., Currier, H. B., Stocking C. R. (1949). Water in the physiology of plants. Waltham : Cronica Botanica.

15. Du Buy, H. G., Olson, R. A. (1938) Protoplasmatic streaming and dynamics of transport through living cells. *Biodynam.*, **2**, 1—18.

16. Du Buy, H. G., Olson, R. A. (1940) The relation between respiration, protoplasmic streaming and auxin transport in the *Avena* coleoptile using a polarographic microrespirometer *Amer. J. Bot.*, **27**, 401—413.

17. Ewart, A. J. (1903) On physics and physology of protoplasmic streaming in plants. Oxford : Clarendon Press.

18. Faasch, W. (1951) Einführung in die wissenschaftliche Kinematographie. Halle.

19. Fitting, H. (1925) Untersuchungen über die Auslösung von Protoplasmaströmung. *Jahrb. Bot.*, **67**, 427—596.

20. Fitting, H. (1928) Untersuchungen über Chemodinese bei *Vallisneria*. *Jahrb. Bot.*, **67**, 427—596.

21. Fitting, H. (1930) Untersuchungen über die Natur des chemodinetischen Reizung und über die Unterschiedschwellen für l-Asparagin. *Z. Bot.*, **23**, 328—360.

22. Fitting, H. (1932) Untersuchungen über die Empfindlichkeit und das Unterscheidungsvermögen der *Vallisneria*-Protoplasten für verschiedene α-Aminosäuren. *Jahrb. Bot.*, **77**, 1—103.

23. Fitting, H. (1933) Untersuchungen über den Plasmaströmung auslösenden Reizstoff in den Blattextrakten von *Vallisneria*. *Jahrb. Bot.*, **78**, 319—398.

24. Fitting, H. (1933) Untersuchungen über den Protoplasmaströmung auslösenden Reizstoff der Pflanzen. *Naturwiss.*, **21**, 489—495.

25. Fitting, H. (1936) Über die Auslösung von Protoplasmaströmung durch chemische Wirkstoffe. *Forschung u. Fortschritte*, **12**, 160—161.

26. Fitting, H. (1936) Über die Auslösung von Protoplasmaströmung bei *Vallisneria* durch einige Histidinverbindungen. *Jahrb. Bot.*, **82**, 613—624.

27. Fitting, H. (1937) Beiträge zur Physiologie der Protoplasmaströmung in den Blättern von *Vallisneria spiralis*. *Ber. deutsch. bot. Ges.*, **55**, 255—261.

28. Frey-Wyssling, A. (1952) The deformation and flow in biological systems. Amsterdam : North-Holland.

29. Frey-Wyssling, A. (1953) Submicroscopic morphology of protoplasm. New York, Amsterdam : Elsevier.

30. Gimesi, N. I. (1942) A növénycytologia mai állása. A survey of modern plant cytology. *Bot. Közl.*, **39,** 123—136. (In Hungarian.)

31. Glick, D. (1949) Techniques of histo- and cytochemistry. New York : Interscience.

32. Goldacre, R. J., Lorch, I. J. (1950) Folding and unfolding of protein molecules in relation to cytoplasmic streaming, amoeboid movement and osmotic work. *Nature*, **166,** 497—500.

33. *Горюхина, Т. А.,* (1952) Урокаминовая кислота как промежуточный продукт распада гистидина в организме нормальных и пораженных опухолям у животных. *Докл. Акад. Наук СССР,* **87,** 645—648.

34. Guilliermond, A., Atkinson, L. R. (1941) The cytoplasm of the plant cell. Waltham : Cronica Botanica.

35. Hille, R. L. M. (1926) Temperatur on protoplasmastrooming. Utrecht : Diss. Auctor.

36. Isawestin, P. W. (1930) Magnetophysiologische Untersuchungen. I. Die Rotationbewegung des Plasma in einem konstanten magnetischen Kraftfelde. *Planta*, **11,** 683—726.

37. Iwamura, T. (1949) Correlations between protoplasmic streaming and bioelectric potential of a slime mold *Physarum polycephalum. Bot. Mag.*, **62,** 126—131.

38. *Кретович, В., Дроздова, Т.* (1948) Окисление аминокислот растительными тканями. *Докл. Акад. Наук СССР,* **63,** 167—170.

39. Kuhl, W. (1949) Die technischen Grundlagen der kinematischen Zellforschung. Springer : Heidelberg.

40. *Курсанов, А. Л.* (1940) Обратимое действие ферментов в живой растительной клетке. Москва : Советская Наука.

41. *Курсанов, Л. И., Комарницкий, Т. А., Мейер, К. И., Расдорский, В. Ф., Уранов, А. А.* (1950) Ботаника. Москва : Учедгиз.

42. Küster, E. (1951) Die Pflanzenzelle. Jena : Fischer.

43. Lehmann, F. E. (1952) Mikroskopische und submikroskopische Bauelemente der Zelle. (Mikroskopische und chemische organisation der Zelle 1—23.) Berlin : Springer.

44. Lepeshkin, W. W. (1937) Zell-Necrobiose und Protoplasma-Tod. Berlin : Borntraeger.

45. Lettré, H. (1951) Zellstoffwechsel und Zellteilung. *Naturwiss.* **38,** 490—496.

46. Lwoff, A. (1951) Biochemistry and physiology of Protozoa. I. New York: Academic Press.

47. *Михлин, Д. М., Броновицкая, З. С.* (1948) О связи между цитохром-цпероксидазой и другими окислительными системами. *Докл. Акад. Наук СССР,* **60,** 1547—1549.

48. *Михлин, Д. М., Колесников, П. А.* (1947) Дыхательная система растений. *Биохимия,* **12,** 452—463.

49. *Михлин, Д. М., Пшенова, К. В.* (1952) О методе вакуум-инфильтрации при изучении корневых каучуконосов. *Докл. Акад. Наук СССР,* **85,** 653—655.

50. *Натансон, Н. Е.* (1952) Влияние некоторых микроэлементов на вязкость плазми растений. *Докл. Акад. Наук, СССР,* **87,** 1067—1070.

51. *Окнина, Е. З.* (1948) О плазмодесмах в растительных клетках, находящихся в состоянии покоя. *Докл. Акад. Наук СССР,* **62,** 705—708.

52. Olson, H. A., Du Buy, H. G. (1940) Factors influencing the protoplasmic streaming in the oat coleoptile. *Amer. J. Bot.*, **27,** 392—401.

53. *Парсин, А. Н., Горюхина, Т. А.* (1952) Ферментативное расщепление л-метилгистидина. *Докл. Акад. Наук СССР,* **84,** 101—104.

54. Pfeiffer, H. H. (1949) Das Polarisationsmikroskop als Messinstrument in Biologie und Medizin, Braunschweig : Vieweg Sohn.

55. Pfeiffer, H. H. (1935) Veränderungen des Strömungsdichroismus an Protoplasmaströmungen pflanzlicher Dauerzellen. *Ber. deutsch. bot. Ges.*, **66,** 2—5.

56. *Проскуряков, Н. И., Мосолова, И. М.* (1952) Динамика глютатиона при прорастании гороха. *Докл. Акад. Наук СССР,* **87,** 465—468.

57. Robertis, E. D. P. de, Nowinski, W. W., Saez, F. A. (1950) General cytology. Philadelphia : Saunders.

58. Saifer, A., Narby, Th. (1953) The photometric microdetermination of gamma globulin in cerebrospinal fluid by a quantitative protein flocculation ninhydrin reaction. *J. Lab. Clin. Med.*, **42,** 316—325.

59. Seifriz, W. (1937) A theory of protoplasmic streaming. *Science*, **86**, 397—398.
60. Seifriz, W. (1950) Les formations sol-gel du protoplasme. *Rev. d'Hématol.*, **5**, 591—602.
61. Sharp, L. W. (1943) Fundamentals of cytology. New York. Mc. Graw-Hill.
62. Simonis, W. (1952) Untersuchungen zum Dürreeffekt. *Planta.* **40**, 313—332.
63. Strugger, S. (1949) Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanzen. Berlin : Springer.
64. Sumner, J. B., Myrbäck, K. (1951) The enzymes. I. New York : Academic Press.
65. *Сисакян, Н. М., Золковер, А. М., Бирюзова, В. И.* (1948) Структура пластид и активность ферментов. *Докл. Акад. Наук СССР*, **60**, 1213—1215.
66. Sweeney, B. M., Thimann, K. V. (1938) The effect of auxine on protoplasmic streaming II. *J. Gen. Physiol.*, **21**, 439—461.
67. Thimann, K. V., Sweeney, B. M. (1937) The effect of auxin upon protoplasmic streaming. *J. Gen. Physiol.*, **21**, 123—235.
68. Umrath, K. (1934) Der Einfluss der Temperatur auf das elektrische Potential, den Aktionsstrom und die Protoplasmaströmung bei *Nitella mucronata. Protoplasma*, **21**, 329—334.
69. Virgin, H. I. (1950) A sozialized effect of light on the protoplasmic viscosity of plant cells. *Nature*, **166**, 485.
70. Virgin, H. I. (1951) The effect of light on the protoplasmic viscosity. *Physiol. Plant.*, **4**, 255—257.
71. Virgin, H. I. (1952) On action spectrum for the light induced changes in the viscosity of plant protoplasm. *Physiol. Plant.* **5**, 575—582.
72. Weber, F. (1930) Vakuolenkontraktion vitalgefärbter *Elodea*-Zellen. *Protoplasma*, **9**, 106—119.
73. Went, F. W. (1938) Remarks on streaming and on bud inhibition. *Chronica Bot.*, **4**, 503—505.
74. Weevers, Th. (1949) Fifty years of plant physiology. Amsterdam : Scheltema Holkema's.
75. Zurzycki, J. (1951) Wpływ temperatury na ruch plazmy u *Elodea densa* Caup. *Acta Soc. Polon.*, **21**, 241—264.

О ФИЗИОЛОГИИ ДВИЖЕНИЯ ЦИТОПЛАЗМЫ

Н. И. ГИМЕШИ, Б.И. ПОЖАР

Авторы изучали вопрос механизма циркуляции цитоплазмы с точек зрений как изменений состояний золь — гель, так и энергетики, учитывая при этом связи данного явления с ферментами.

Согласно опытам авторов, α-аминокислоты путем уменьшения вязкости цитоплазмы оказывают действие на скорость циркуляции плазмы. В этом процессе гидролитическое действие папаина вызывает повышение уровня свободной аминокислоты. В подтверждение этого явления авторы получили вполне совпадающие результаты, как количественным измерением аминокислот, так и активацией папаина in situ (глутатион, цистеин, аскорбиновая кислота). Двувалентные и многовалентные катионы антагонизируют действие α-аминокислот, вызывающее состояние золь, однако, нельзя пренебрегать также застуденевающей ролью калия.

Торможение процесса цианистым калием — в полном соответствии с данными литературы — небольшого размера по сравнению с торможениями дыхания, из чего можно предполагать, что при катализе производящих энергию процессов роль играют также и нечувствительные к цианистым соединениям ферменты (флавопротеины). Тормозящее действие фторида натрия гораздо значительнее, однако, в противоположность цианистому калию эту соединение в меньшей концентрации имеет скорее стимулирующее действие.

Согласно наблюдениям авторов, циркуляция цитоплазмы после обработки перманганатом калиня может распространяться и на вакуоли, причем состав геля вакуолей скоагулируется обратимо. Застуденевавшееся скопление вторично может опять преобразоваться в вакуоли.

ÜBER DIE PHYSIOLOGIE DER ZYTOPLASMABEWEGUNG

N. I. GIMESI und B. I. POZSÁR

Der Verfasser untersucht die Frage des Mechanismus der Zytoplasmabewegung einerseits vom Gesichtspunkt der Solgel-Zustandsänderung, andrerseits von dem der Energetik, u. zw. mit besonderer Rücksicht auf die enzymatischen Beziehungen dieser Erscheinung.

Laut der Versuche wirken die α-Aminosäuren auf die Geschwindigkeit der Plasmaströmung durch die Verringerung der Zytoplasmaviskosität. Die hydrolytische Spaltung des Papains knüpft sich an diesen Vorgang durch die Erhöhung der Konzentration an freier Aminosäure an, was übereinstimmend durch die quantitative Messung der Aminosäuren und der in situ Aktivierung des Papains (Glutathion, Zystein, Askorbinsäure) bewiesen wurde. Die solifizierende Wirkung der α-Aminosäuren wird von den zwei- oder mehrwertigen Kationen antagonisiert, doch darf auch die gelifizierende Rolle des Kaliums nicht übersehen werden.

In Übereinstimmung mit den Literaturangaben ist die Zyankaliumhemmung im Vergleich zu den Atmungshemmungen geringfügig, was darauf schliessen lässt, dass in der Katalyse der energieproduzierenden Vorgänge auch zyanunempfindliche Enzyme eine Rolle spielen (Flavoprotein). Die hemmende Wirkung des Natriumfluorids ist viel entschiedener, doch weist sie in kleineren Konzentrationen — im Gegensatz zum Zyankalium — einen stimulierenden Charakter auf.

Den Beobachtungen gemäss kann die Zytoplasmaströmung nach einer Kaliumpermanganatbehandlung auch auf die Vakuole übergreifen, wobei die Gelsubstanz der Vakuole reversibel koaguliert. Die gelifizierte Substanz kann sich sekundär wieder vakuolisieren.

BÉLA POZSÁR, Budapest, V., Szalay u. 10—14., VI/38.

EXPERIMENTELLE BEEINFLUSSUNG DER GEWEBE-QUALITÄT DES AMPUTATIONSSTUMPFES

BEITRÄGE ZUR WIRKUNG ÄUSSERER FAKTOREN AUF DIE REGENERATION

L. BALÁZSY

INSTITUT FÜR ANATOMIE, HISTOLOGIE UND EMBRYOLOGIE DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, DEBRECEN
(VORSTAND: I. KROMPECHER)

(Eingegangen am 16. September 1954)

Zusammenfassung

Durch Versuche sollte nachgewiesen werden, dass die Kräfte der Umgebung, d. h. Druck und Funktion, auf die Entwicklung der geweblichen Qualität der Regeneration — im vorliegenden Fall beim Amputationsstumpf — entscheidende Wirkung ausüben.

47 Ratten wurden operiert, wobei die Amputation teils hoch in der Mitte des Femurs, teils tief an der Grenze des mittleren und unteren Drittels der Tibia ausgeführt wurde. Bei hoher Amputation konnte sich die Ratte infolge des kurzen Stumpfes beim Gehen nicht auf diesen stützen, so dass keine äussere Kraft zur Geltung kommen konnte; und da die Amputation in diesem Falle in grösserer Entfernung sowohl vom distalen als auch vom proximalen Epiphysenknorpel in der Mitte des Femurs erfolgte, vermochten auch die in der Nähe der Epiphysenknorpel wirkenden chemischen, biologischen Kräfte nicht in Erscheinung zu treten. Infolgedessen kam es *bei hoher Amputation in keinem einzigen Falle zur Knorpelbildung.*

Bei tiefer Amputation war die Gliedabsetzung an der Grenze des unteren und mittleren Drittels der Tibia vorgenommen worden; diese Tiere benutzten 3—4 Tage nach der Operation ihre auf diese Weise amputierte Extremität beim Gehen zum Aufstützen, wodurch auf das Stumpfende von aussen ein Druck wirkte. Bei den tief amputierten 18 Tieren (von denen 9 erwachsen und 9 jung waren) hatte sich in 80% der Fälle Knorpel gebildet, als Beweis dafür, dass die äusseren Kräfte (Druck, Inanspruchnahme, d. h. die Funktion) auf die Qualität der Regeneration von entscheidendem Einfluss sind.

Dieser Befund wird durch Kontrollversuche bestärkt, bei denen 6 Ratten tief amputiert und ihre Extremitäten in ganzer Länge unter die Bauchhaut genäht wurden; gegenüber dem eben erwähnten 80%igen Knorpelbefund hatte sich hier in keinem Falle Knorpel gebildet.

Einleitung

Nach dem heutigen Stande der Wissenschaft ist es eine unzweifelhaft erwiesene Tatsache, dass die Gewebequalität der Regeneration und Neodifferenzierung nicht nur von den innerhalb des Organismus wirkenden Kräften, sondern auch von gut definierbaren äusseren Faktoren entscheidend beeinflusst wird.

Bei unseren Versuchen waren wir bestrebt, die Heilung des Amputationsstumpfes qualitativ zu beeinflussen. Vor allem wollten wir beweisen, dass neben den inneren Faktoren auf die Qualität der Regeneration des Knochens die auf diesen von aussen wirkenden Umgebungskräfte ebenso von entscheidendem Einfluss sind, wie dies bei jedem zur Regeneration geeigneten Gewebe angenommen werden kann.

Für die Durchführung dieser Versuche gab uns teilweise auch das 1949 erschienene Buch von LACROIX «L'organisation des os» die Anregung, in dem sich ein Abschnitt mit dem Titel «Reconstitution d'un cartilage de croissance

après amputation» mit der Regeneration des Amputationsstumpfes, unter besonderer Berücksichtigung des Epiphysenknorpels, befasst.

LACROIX hatte festgestellt, dass wenn er den Femur von 12tägigen Ratten etwa 2 mm über dem Epiphysenknorpel amputierte, nach 21 Tagen bei 4 von 7 Versuchstieren auf den histologischen Schnitten am Stumpfende enchondrale Ossifikation zustande gekommen war.

Aus dieser Beobachtung zog LACROIX die Schlussfolgerung, dass — um wörtlich zu zitieren : «un principe soluble dans l'alcool», d. h. dass es ein alkohollösliches Prinzip sei, auf dessen Wirkung der erwähnte Knorpel bzw. die enchondrale Ossifikation am Ende des Amputationsstumpfes erscheint. Zweifellos kann auch dieses eine Rolle spielen und spielt sie wahrscheinlich auch. Den im Innern des Organismus wirkenden Kräften, ob es sich nun um alkohollösliche Lipoide oder um andere Substanzen handelt (LACROIX gibt in dieser Arbeit keine nähere Erklärung), kommt in der Regeneration unbedingt eine Bedeutung zu. Indessen ging LACROIX einseitig vor, als er diese von ihm gar nicht definierte Ursache als einzige Ursache bezeichnete und die Wirkung der äusseren Faktoren ausser Acht liess, obwohl zahlreiche Literaturangaben bekannt sind, aus denen hervor geht, dass die Qualität der Regeneration des Granulationsgewebes von äusseren Kräften entscheidend beeinflusst wird. Hier soll vor allem auf die zahlreichen experimentellen Resultate von KROMPECHER hingewiesen werden, welche alle beweisen, dass wenn auf das Granulationsgewebe oder junge Knochengewebe von aussen ein entsprechender Druck ausgeübt wird, eine Differenzierung in Richtung auf den Knorpel eintritt. Aus den Untersuchungen des genannten Autors ist ferner bekannt, dass auf die Qualität der Differenzierung bzw. Regeneration auch Stärke und Richtung des Drucks in hohem Masse von Einfluss sind ; er stellte nämlich fest, dass wenn auf ein Knochenende starker Druck ausgeübt wird, Knochenresorption zustande kommt, während bei physiologischem Druck Knorpel entsteht. Wenn auf das Knochenende kein Druck wirkt, tritt einfach die Vernarbung des Knochens ein. Als eine Bestätigung dieser Ergebnisse KROMPECHERs durch Zahlenangaben kann die experimentelle Mitteilung von FRIEDENBERG und FRENCH aufgefasst werden, dass bei der Wirkung von 16 kg Gewicht auf die Ulna des Hundes Knochenresorption, bei 4—8 kg Gewicht Knorpelbildung entstand, währe nd die Knochenwunde, wenn kein mechanischer Reiz auf sie wirkte, einfach heilte.

Selbsverständlich können wir die Wirkung der inneren Faktoren nicht leugnen. Die Wirkung chemischer, biologischer Faktoren auf das sich differenzierende Gewebe kann nicht in Zweifel gezogen werden. Neben der Anerkennung dieser Tatsache wollen wir in vorliegender Arbeit darauf hinweisen, dass neben diesen inneren Faktoren den äusseren Kräften (Funktion, Inanspruchnahme, Druck) eine nicht minder wesentliche Bedeutung zukommt.

Versuche und Resultate

Im Laufe der Versuche operierten wir insgesamt 47 Ratten, die in zwei Versuchsserien eingeteilt wurden. Die operierten Tiere der ersten Serie stellten das eigentliche Versuchsmaterial dar, während die Tiere der zweiten Gruppe die Kontrollversuche bildeten. Der besseren Übersichtlichkeit wegen wollen wir diese Aufteilung auch weiterhin benutzen, d. h. die in der I. und II. Serie durchgeführten Versuche und deren Resultate gesondert besprechen. Mit Bezug auf beide Serien (d. h. die I. und II.) sei bemerkt, dass die Tiere in jedem Falle 3 Wochen nach der Operation getötet wurden, die Amputation an der linken hinteren Extremität erfolgte, das zu untersuchende Material in Susa fixiert und dekalziniert und sodann nach Paraffineinbettung die Schnitte mit verschiedenen üblichen Methoden gefärbt wurden (die reproduzierten Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin).

Versuchsserie I

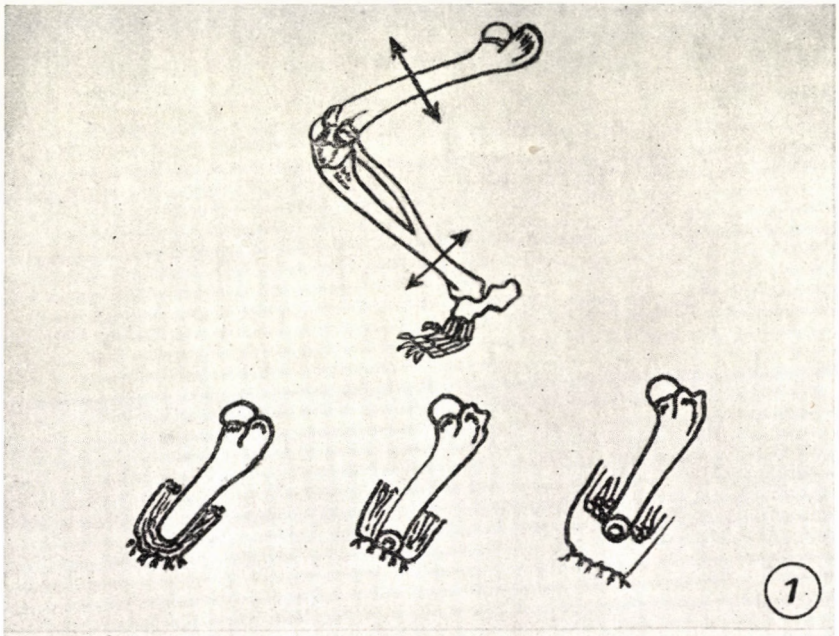
Zu dieser Gruppe gehören die Tiere, die das eigentliche Versuchsmaterial darstellen. Es wurden 36 Tiere operiert, von denen 18 jung (3—4 Wochen alt!) und 18 erwachsen (mehr als 2 Monate alt) waren. Mit dieser Versuchsgruppe verfolgten wir den Zweck, den entscheidenden Einfluss der äusseren Kräfte auf die gewebliche Qualität der Regeneration, im vorliegenden Fall auf den Amputationsstumpf, zu beweisen.

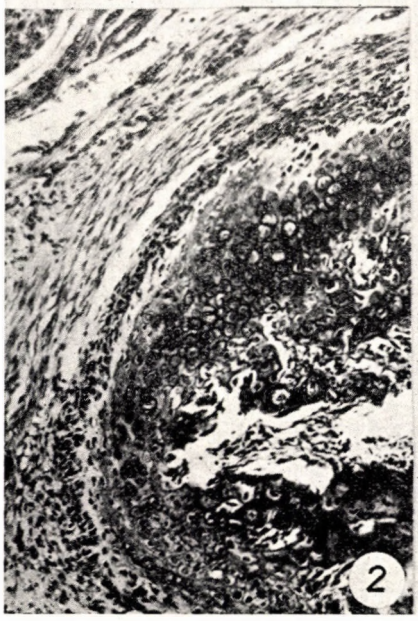
Die Amputation wurde auf zweierlei Art vorgenommen. Bei 9 jungen und 9 erwachsenen, d. h. bei insgesamt 18 Tieren wurde eine hohe und bei 9 erwachsenen und 9 jungen, d. h. insgesamt 18 Tieren eine tiefe Amputation der Extremität durchgeführt.

Unter hoher Extremitätenamputation verstehen wir die Gliedabsetzung an der Mitte des Femurs, d. h. erheblich über dem distalen Epiphysenknorpel und wesentlich unter dem proximalen Epiphysenknorpel (Abb. 1/*a*).

Die tiefe Extremitätenamputation wurde an der Grenze des mittleren und Unteren Drittels der Tibia vorgenommen, d. h. erheblich über dem distalen Epiphysenknorpel der Tibia (Abb. 1/*a*).

Mit der auf diese beiden Arten vorgenommenen Amputation erreichten wir, dass das Tier den Stumpf des am Femur (hoch) amputierten Beines wegen dessen Kürze beim Gehen nicht zum Aufstützen benutzen konnte, während jene Tiere, die wir an der Tibia (tief) amputiert hatten, wie aus sorgfältigen Beobachtungen hervorging, 3—4 Tage nach dem Eingriff beim Gehen auch die amputierte Extremität benutzten, wodurch der Stumpf des auf diese Weise amputierten Beines einem Druck von aussen ausgesetzt war. Die tief amputierten 18 (9 jungen und 9 erwachsenen) Tiere waren also dazu berufen, unseren Standpunkt zu bestätigen. Die Operationen wichen nicht nur hinsichtlich der





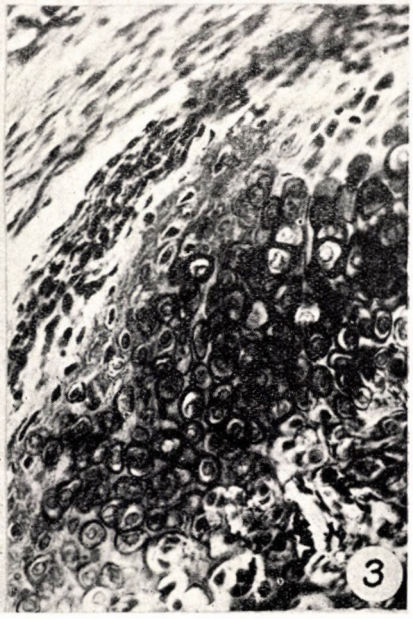


Abb. 1. Skizze der durchgeführten Operationen

Abb. 2. **Tief amputierte Extremität einer erwachsenen Ratte. Vor den neugebildeten Knochenbalken sowie am Vorderende des Stumpfes ist der aus Granulationsgewebe auf Druckwirkung differenzierte Knorpel gut zu sehen**

Abb. 3. Ein Teil des auf Abb. 2 sichtbaren Knorpels, vergrössert

Höhe der Amputation voneinander ab, sondern auch die endgültige Versorgung des Stumpfes geschah auf verschiedene weise (Abb. 1). Bei einigen Tieren stellten wir vor dem Stumpf eine enge Muskel- und Hautnaht her (Abb. 1/*b*), bei anderen wurde der Muskel nicht genäht, aber die Haut eng geschlossen (Abb.1/*c*), und bei wieder anderen wurde der Muskel nicht genäht und auch die Haut nicht eng, sondern sackartig vor dem Stumpf geschlossen (Abb. 1/*d*).

Auch mit dieser verschiedenen Art der endgültigen Stumpfversorgung wollten wir die auf das Stumpfende wirkende Druckkraft regulieren. Wir gingen von der Überlegung aus, dass auch die enge Muskel- und Hautnaht selbst einen gewissen Druck am Ende des Stumpfes sichert ; die enge Hautnaht ohne Muskelnaht stellt eine geringere Druckkraft dar, während bei der sackartigen Hautnaht ein Druck dieser Art nicht in Frage kommt. Im Endergebnis wurden die Operationen bei der Versuchsserie I. nach den Angaben der folgenden Tabelle durchgeführt.

Versuchsserie I

Gruppe A	6 erwachsene Ratten	3 hoch amp. 3 tief amp.	Enge Muskel- und Hautnaht	Abb. 1, b
	6 junge Ratten	3 hoch amp. 3 tief amp.		
Gruppe B	6 erwachsene Ratten	3 hoch amp. 3 tief amp.	Enge Hautnaht ohne Muskelnaht	Abb. 1, c
	6 junge Ratten	3 hoch amp. 3 tief amp.		
Gruppe C	6 erwachsene Ratten	3 hoch amp. 3 tief amp.	Sackartige Hautnaht ohne Muskelnaht	Abb. 1, d
	6 junge Ratten	3 hoch amp. 3 tief amp.		

Gruppe A

6 erwachsene Ratten. Drei wurden hoch und drei tief amputiert. Am Stumpfende wurde eine enge Muskel- und Hautnaht hergestellt (Abb. 1/*b*). Die Aufarbeitung geschah 3 Wochen nach der Operation.

Ergebnis : Bei den Hochamputierten entstand in keinem einzigen Falle Knorpelbildung, bei den Tiefamputierten kam bei 2 von 3 Tieren (Abb. 2 und 3) Knorpelbildung zustande.

6 junge Ratten. Drei wurden hoch und drei tief amputiert. Am Stumpfende machten wir eine enge Muskel- und Hautnaht. Die Aufarbeitung erfolgte 3 Wochen nach dem Eingriff.

Ergebnis : Bei den Hochamputierten trat in keinem Falle Knorpelbildung ein, bei den Tiefamputierten kam bei 2 von 3 Tieren (Abb. 4) Knorpelbildung zustande.

Gruppe B

6 erwachsene Ratten : Drei wurden hoch, drei tief amputiert. Am Stumpfende wurde keine Muskelnaht hergestellt, jedoch die Haut eng vernäht (Abb. 1/*c*). Die Aufarbeitung geschah nach 3 Wochen.

Ergebnis : Bei den Hochamputierten war in keinem Falle Knorpelbildung eingetreten. Bei den Tiefamputatierten hatte der Stumpf die eng genähte Haut durchstossen, so dass der Knochen mit der Umwelt in Berührung kam ; infolgedessen waren selbst die elementaren Voraussetzungen der Knorpelbildung nicht gegeben. Vom Gesichtspunkt der Knorpelbildung waren also diese Tiere nicht bewertbar (Abb. 5).

6 junge Ratten : Drei wurden hoch, drei tief amputiert. Am Stumpfende machten wir keine Muskelnaht, vernähten aber die Haut eng. Die Aufarbeitung geschah 3 Wochen nach der Operation.

Ergebnis : Bei den hochamputierten Tieren konnte Knorpelbildung in keinem Falle festgestellt werden, bei den tief amputierten Tieren hatte sich in 2 von 3 Fällen (Abb. 6) Knorpel gebildet.

Gruppe C

6 erwachsene Ratten : Drei wurden hoch, drei tief amputiert. Vor dem Stumpf wurde die Muskulatur nicht genäht und die Haut nicht eng, sondern sackartig geschlossen (Abb. 1/*d*). Die Aufarbeitung geschah 3 Wochen nach dem Eingriff.

Ergebnis :. Bei den hochamputierten Tieren hatte sich in keinem einzigen Falle Knorpel gebildet, bei den tief amputierten 3 Tieren war in allen Fällen (Abb. 7) Knorpelbildung zustande gekommen.

6 junge Ratten : Drei wurden hoch, drei tief amputiert. Vor dem Stumpf wurde die Muskulatur nicht genäht und die Haut nicht eng, sondern sackartig geschlossen. Die Aufarbeitung erfolgte 3 Wochen nach der Operation.

Ergebnis : Bei den Hochamputierten war Knorpel in keinem Fall entstanden, bei den Tiefamputierten hatte sich in sämtlichen 3 Fällen (Abb. 8) Knorpel gebildet.

Versuchsserie II

In dieser Versuchsserie erachteten wir es zur Vervollständigung unserer Untersuchungen für nötig, teils die eigenen, teils die Versuche von *Lacroix* zu

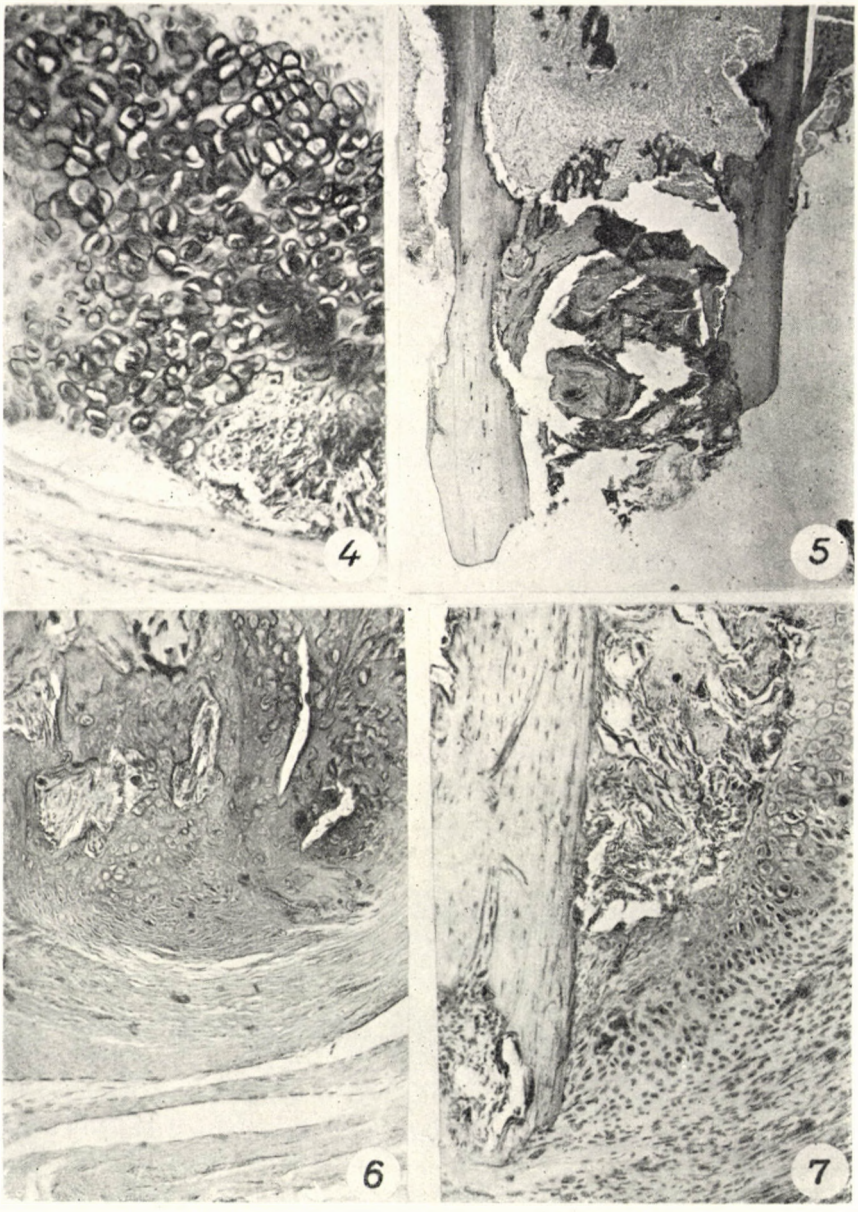


Abb. 4. Tiefamputierte Extremität einer jungen Ratte. Durch die beim Gehen entstandene Druckwirkung hat sich aus dem Granulationsgewebe Knorpel differenziert

Abb. 5. Der Stumpf hat die eng genähte Haut durchstossen. An den Knochenbalken hochgradiger Abbau

Abb. 6. Tiefamputierte Extremität einer jungen Ratte. Am Ende des Knochenbalkens junges Knorpelgewebe

Abb. 7. Tiefamputierte Extremität einer erwachsenen Ratte. Über der an der Seite des Knochenbalkens herauswachsenden Osteophyte hochgradige Knorpelbildung

kontrollieren. (Die eigene Kontrolle wird als Gruppe *D*, die Kontrolle der Versuche von *Lacroix* als Gruppe *E* bezeichnet.)

Gruppe D

Zur Durchführung der Kontrolle unserer eigenen Versuche hatte uns die Beobachtung veranlasst, dass in der Versuchsreihe I. bei den hoch amputierten Tieren in keinem einzigen Fall, dagegen bei den tief amputierten Tieren, die ihren Stumpf beim Gehen zum Aufstützen zu benutzen vermochten, in 80% der Fälle 3 Wochen nach der Operation am Stumpfende Knorpelbildung zustande gekommen war. Naturgemäss ergab sich für uns die Frage, was geschehen würde, wenn wir bei den tief amputierten Tieren das Gehen auf dem Stumpf auf irgendeine Weise verhindern und so den von aussen auf den Stumpf wirkenden Druck ausschalten würden. Würde sich auch in diesem Falle Knorpel bilden?

Nach mühevollen Versuchen stellten wir fest, dass das Tier unfähig wird, den Stumpf beim Gehen zu benutzen, wenn wir die amputierte Extremität in ihrer ganzen Länge an die Bauchhaut des Tieres nähen ; dadurch konnte der von aussen wirkende Druck mit Sicherheit ausgeschaltet werden.

Operationen :

6 Ratten wurden operiert, 3 erwachsene und 3 junge Tiere, in allen Fällen durch tiefe Amputation an der Tibia. 3 Wochen nach dem Eingriff wurden die Tiere getötet und aufgearbeitet.

Ergebnis : Knorpelbildung konnte bei keinem einzigen der 6 Tiere festgestellt werden (Abb. 9).

Gruppe E

Kontrolle der Versuche von LACROIX. Bei den eigenen Versuchen hatten wir 3—4wöchige Ratten als «junge» Tiere betrachtet, die 2 Monate alten oder älteren als «erwachsene» Ratten. Bei der Kontrolle der Versuche von LACROIX operierten auch wir natürlich Ratten, die mit Sicherheit 12 Tage alt waren. In Kenntnis der Lage der distalen Epiphysenknorpelscheibe des Rattenfemurs suchten wir die Amputation 2 mm vom höchsten proximalwärts reichenden Punkt der Wirbelscheibe vorzunehmen, um so die Möglichkeit auszuschliessen, dass ein Knorpelteil zurückbleibt. Doch auch bei einem derart sorgfältigen Operationsverfahren kamen noch Fehler vor, auf die wir weiter unten näher eingehen werden.

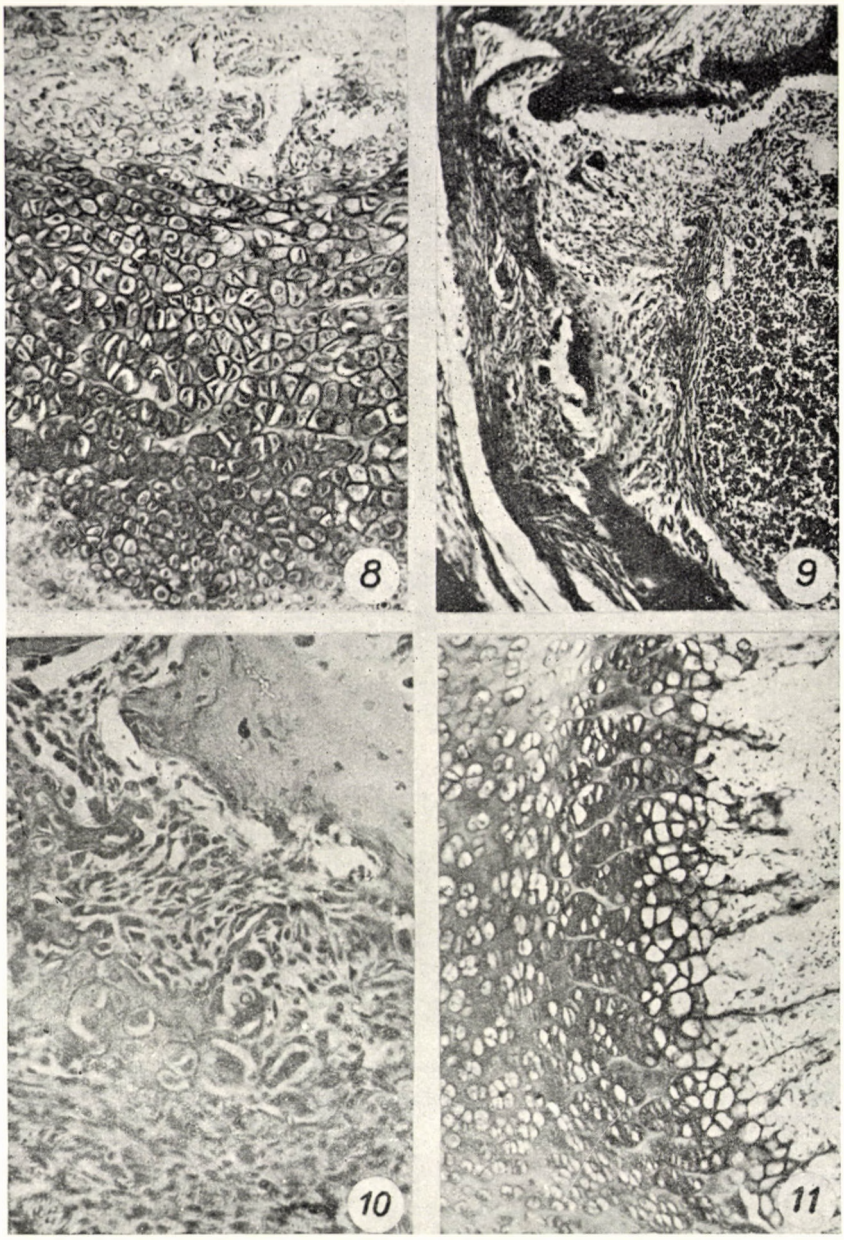


Abb. 8. Tiefamputierte Extremität einer jungen Ratte. Masse von grossen, geschwollenen Knorpelzellen an der einem Druck ausgesetzten Stelle des Knochenbalkens

Abb. 9. Tiefamputierte Extremität einer jungen Ratte, die in ganzer Länge an die Bauchhaut genäht wurde. Keine Knorpelbildung

Abb. 10. Kleine Knorpelinsel im Granulationsgewebe, von der 15—20 Chondrone in die Schnittebene fallen

Abb. 11. 2 mm über dem Epiphysenknorpel amputierte Extremität einer 12tägigen Ratte. Am Stumpfende enchondrale Ossifikation. (Mit dem von LACROIX beschriebenen Befund völlig übereinstimmendes Bild.)

Operationen :

5 Stück 12 Tage alte Ratten wurden nach der Beschreibung von Lacroix operiert, d. h. die Amputation wurde 2 mm vom distalen Epiphysenknorpel des Femurs vorgenommen. Vor dem Ende des Stumpfes wurde nur die Haut vereinigt. Die Aufarbeitung der Tiere geschah 3 Wochen nach dem Eingriff.

Ergebnis : Bei 3 von 5 Tieren konnte keine Spur von Knorpelbildung festgestellt werden, in einem Falle sahen wir eine aus 15—20 Knorpelzellen bestehende Knorpelinsel und in einem Falle ein Bild, das mit der von LACROIX und SELYE beschriebenen enchondralen Ossifikation völlig übereinstimmte (Abb. 10, 11).

Besprechung der Ergebnisse

Unsere experimentellen Resultate beweisen, dass wir in dieser Frage weiter gekommen sind als BANKS und COMPERE sowie SELYE oder LACROIX, die am Ende des Amputationsstumpfes nur dann Knorpel bzw. enchondrale Ossifikation feststellen konnten, wenn sie entweder den distalen Epiphysenknorpel unmittelbar vom Femur ablösten (SELYE, 1934) oder die Amputation 2 mm über der distalen Epiphysenknorpelscheibe des Femurs ausführten (LACROIX bzw. TEUCQ). Diese Operationstechnik bzw. Amputationsmethode hatte bei NUNNEMACHER (1939) und auch bei uns den Gedanken erweckt, dass der auf diese Weise beobachtete Knorpel nichts anderes ist als das Resultat einer unvollständigen Knorpelentfernung. Neben NUNNEMACHERs und unserem eigenen Standpunkt muss jedoch folgendes angeführt werden :

Wir leugnen nicht, dass die unmittelbare Umgebung des Epiphysenknorpels bei ganz jungen Tieren über eine gewisse Knorpelbildungsfähigkeit verfügt, da ja in dieser Beziehung zahlreiche Fälle erwähnt werden können, die alle beweisen, dass den auch von uns anerkannten inneren chemischen bzw. biologischen Faktoren in der Regeneration eine Rolle zufällt. Indessen müssen wir jedes Bestreben als abwegig bezeichnen, das die neuesten Ergebnisse der Forschung ausser Betracht lässt und ausschliesslich diesen inneren Kräften Bedeutung beimisst, die Umgebungsfaktoren (Funktion, Inanspruchnahme, mechanische Kräfte: Druck, Ziehen usw.) jedoch vollkommen unberücksichtigt lässt. Auch bei unseren Versuchen sprechen die Resultate bei den Gruppen *A*, *B*, *C* und *D* dafür, dass die äusseren Kräfte die Regeneration in entscheidender Weise beeinflussen.

Es ergibt sich nun die Frage, wie es möglich war, dass SELYE, LACROIX bwz. TEUCQ, ja auch wir selbst bei 2 von 5 Tieren 3 Wochen nach der Amputation von 12tägigen Ratten Knorpelbildung bzw. enchondrale Ossifikation am Ende des Amputationsstumpfes feststellen konnten.

Um diese Erscheinungen verstehen zu können, müssen wir die Ursache kennen, die sie zustande brachte. Gehen wir also vom ersten Moment aus und untersuchen wir die Durchführungsart der Operation.

SELYE hatte die Amputation so vorgenommen, dass er den Epiphysenknorpel bzw. zu gleicher Zeit auch die distale Epiphyse des Femurs von der Diaphyse ablöste. Es braucht nicht besonders betont zu werden, dass auf diese Weise auch bei dem sorgfältigsten, umsichtigsten Vorgehen zahlreiche, von Operationsfehlern stammende irrtümliche Resultate entstehen können, da das Zurückbleiben von Knorpelinseln bei Anwendung dieser Methode nicht ausgeschlossen werden kann.

LACROIX bzw. TEUCQ haben die Amputation 2 mm proximalwärts vom distalen Epiphysenknorpel des Femurs vorgenommen. Im Hinblick darauf, dass der distale Epiphysenknorpel des Rattenfemurs nicht eine in einer Ebene liegende Scheibe ist, sondern seine Linie wellig verläuft, ferner mit Rücksicht darauf, dass bei jungen rachitischen Tieren auch im tieferen Teil der Diaphyse Knorpelinseln zurückbleiben, ist es offensichtlich, dass wenn die sorgfältige Untersuchung, die auf jedes einzelne Tier ausgedehnt werden muss, versäumt wird, anlässlich einer 2 mm vom Epiphysenknorpel durchgeführten Amputation Knorpelteile zurückbleiben.

Als wir die Amputation bei 18 Tieren, die allerdings älter als 12 Tage waren, in der Mitte des Femurs vornahmen, ist in keinem einzigen Falle Knorpel entstanden.

Für uns ist auch die Tatsache von grosser Bedeutung, dass sowohl SELYE als auch LACROIX nur in dem Falle Knorpel am Ende des Amputationsstumpfes feststellen konnten, wenn sie zu ihren Versuchen ganz junge (12 Tage alte) Tiere verwendeten. Wenn sie Tiere operierten, die weniger jung waren (SELYE), war Knorpelbildung nicht mehr festzustellen.

Obwohl wir keine Ursache hatten, die Ergebnisse von SELYE oder LACROIX in Zweifel zu ziehen, konnten wir der Erklärung, wonach die Knorpelbildung ausschliesslich von inneren, induktiven Faktoren hervorgerufen werde, nicht zustimmen. Wir gingen von der schon in der Einleitung erwähnten experimentell begründeten Beobachtung KROMPECHERs aus, dass die Regeneration nicht nur von innerhalb des Organismus wirkenden inneren chemischen, biologischen Kräften, sondern auch von Einwirkungen (Umweltwirkung, Inanspruchnahme, Funktion usw.) entscheidend beeinflusst wird, die den Organismus von aussen erreichen.

Unsere Versuche unterscheiden sich von denen der oben erwähnten Autoren (SELYE, LACROIX bzw. TEUCQ) hauptsächlich in zwei Punkten: 1. in der Lösung der Operationstechnik, 2. in bezug auf das Alter der zu den Versuchen verwendeten Tiere.

ad 1. Das von uns verwendete Operationsverfahren ist weiter oben bereits ausführlich geschildert worden. Hier sei nur noch mit Nachdruck betont, dass

wir weder die hohe noch die tiefe Amputation bei den Tieren der Gruppen *A*, *B*, *C*, *D* in der Nähe des Epiphysenknorpels ausgeführt haben.

ad 2. In bezug auf die Gruppen *A*, *B*, *C* und *D* halten wir ebenfalls die Feststellung für wichtig, dass wir in diesen Gruppen als «junge» Tiere 3—4 Wochen alte und als «erwachsene» Tiere mehr als 2 Monate alte Ratten verwendeten, bei denen wir in zahlreichen Fällen Knorpelbildung antrafen, im Gegensatz zu den Beobachtungen von SELYE und LACROIX, die Knorpelbildung nur bei 12tägigen Ratten wahrnahmen.

Bei der in der Mitte des Femurs ausgeführten Amputation konnten wir weder auf Grund der Ausführungen von LACROIX noch unserer eigenen Annahme Knorpelbildung erwarten. Laut LACROIX deshalb nicht, weil wir die Amputation in grösserer Entfernung sowohl vom proximalen als auch vom distalen Epiphysenknorpel vorgenommen haben; nach unserer Auffassung deshalb nicht, weil im Hinblick auf die Kürze des Stumpfes des Gehen auf diesem für das Tier unmöglich war, so dass in Ermangelung eines von aussen wirkenden Druckes im Granulationsgewebe Knorpelbildung nicht zustande kommen konnte. Darüber hinaus konnte jedoch bei dieser Amputationsmethode auch die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass vom Epiphysenknorpel Inseln zurückbleiben.

Die erzielten Resultate haben unsere Erwartung vollauf bestätigt, da die auf diese Weise durchgeführte Ausschaltung der inneren und äusseren Kräfte dazu führte, dass bei den 18 hoch am Femur amputierten Tieren, von denen 9 jung und 9 erwachsen waren, sich in keinem einzigen Falle Knorpen gebildet hatte. Im Zusammenhang mit diesem Ergebnis könnte man annehmen, dass SELYE und LACROIX also Recht hatten, als sie sagten, dass am Ende des Stumpfes keine Knorpelbildung zustande kommt, wenn über 12 Tage alte Tiere operiert werden. Diese Feststellung ist jedoch von unseren weiteren Resultaten widerlegt worden.

Als wir nämlich die Amputation tief, an der Tibia, erheblich über dem distalen Epiphysenknorpel bei insgesamt 18 Tieren ausführten, von denen 9 jung und 9 erwachsen waren, fanden wir, dass (mit Ausnahme von 3 Tieren, bei denen der Knochen die eng genähte Haut durchstossen hatte und daher die elementaren Voraussetzungen der Knorpelbildung nicht gegeben waren) sich bei 12 der bewertbaren 15 Tiere, d. h. in 80% der Fälle Knorpel gebildet hatte. Bei den 9 jungen Tieren ergab sich in 7 Fällen ein positives Resultat, bei den 9 erwachsenen Tieren in 5 Fällen. Dieses Ergebnis beweist unzweifelhaft, dass die Richtung der Regeneration von der Umgebungswirkung, im vorliegenden Falle von dem von aussen wirkenden Druck und von der Funktion (Gehen auf dem Stumpf) entscheidend beeinflusst wird.

In den Kontrollversuchen hatte sich in der Gruppe *D*, bei der wir die tief amputierte Extremität in ganzer Länge unter die Bauchhaut genäht hatten, unserer Erwartung entsprechend bei keinem der 3 erwachsenen und 3 jungen

Tiere Knorpel entwickelt, da sich diese Tiere im Hinblick auf das Aufnähen des Stumpfes beim Gehen nicht auf die amputierte Extremität stützen konnten. In der Gruppe *E*, die zur Kontrolle der Versuche von LACROIX bzw. SELYE diente, hatten wir 5 Ratten im Alter von 12 Tagen operiert und die Amputation 2 mm über dem distalen Epiphysenknorpel des Femurs ausgeführt. In einem Falle erhielten wir ein mit der von LACROIX und SELYE beobachteten enchondralen Ossifikation völlig übereinstimmendes histologisches Bild, in einem Falle befand sich am Ende des Amputationsstumpfes eine aus 15—20 Knorpelzellen bestehende Knorpelinsel. In 40% der Fälle war also Knorpel entstanden, während wir in 3 Fällen keine Spur von Knorpel festzustellen vermochten.

Die Beobachtung der 3 letzten Fälle veranlasste uns, diejenigen Fälle, bei denen Knorpelbildung festgestellt wurde, eingehender zu untersuchen, inwieweit die Möglichkeit bestand, dass bei diesen Tieren anlässlich der Operation Knorpel zurückgeblieben sei. So wurden Verlauf und Lage der Epiphysenknorpelscheibe gründlicher untersucht, über die wir vorstehend eine ausführliche Beschreibung geben.

LITERATUR

1. *Цуверкалов, Д. А.* (1949) Биохимические основы остеогенеза. *Пробл. Советской Физиол. Биохим. Фарм.*, 846—848.

2. FRIEDENBERG, Z. D., FRENCH, G. (1952) The effects of known compression forces on fracture healing. *Surg. Gyn. Obst.*, **94,** 743—748.

3. GLÜCKSMANN, A. (1939) Studies on bone mechanism in vitro. II. The role of tension and pressure in chondrogenesis. *Anat. Rec.*, **73,** 39—55.

4. GLÜCKSMANN, A. (1942) The role of mechanical stresses in bone formation in vitro. *J. Anat.*, **74,** 231—239.

5. KROMPECHER, S. (1937) Die Knochenbildung. Jena : Fischer.

6. KROMPECHER, S. (1943) Izületképzés. Die Gelenkbildung. Kolozsvár : Minerva. (Ungarisch.)

7. KROMPECHER, S. (1947) The effect of adequate physical influences on cell differentiation in animals and in man during regeneration. *Exp. Cell. Res. Suppl.*, **1,** 522—524.

8. LACROIX, P. (1949) L'organisation des os. Louvain : Masson.

9. LEBLAND, C. P., WILKINSON, C. W., BELANGER, L. F., ROBICHON, J. (1950) Radioautographic visualisation of bone formation in the rat. *Amer. J. Anat.*, **86,** 289—342.

10. LEVANDER, G., WILLSAEDT, H. (1946) Alcohol soluble osteogenetic substance from bone-marrow. *Nature.* **157,** 587.

11. SELYE, H. (1934) On the mechanism controlling the growth in length of the long bone. *J. Anat.*, **68,** 289—292.

12. TEUCQ, E. (1948) Reconstitution d'un cartilage de croissance après amputation. *Arch. Biol.*, **59,** 1—6.

13. WELCKER, E. K. (1938) Experimentelle Erzeugung heterotoper Knochenbildungen. *Arch. klin. Chir.*, **191,** 372—420.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА КАЧЕСТВО ТКАНИ АМПУТАЦИОННОЙ КУЛЬТИ

Л. БАЛАЖИ

Автор на основании своих опытов стремился доказать, что внешние силы, то есть давление и функция, играют решающую роль при образовании качества ткани при восстановлении, в данном случае в связи с ампутационной культей.

Проводилась операция на 47 крысах. Ампутация была проведена отчасти высоко в середине бедренной кости, отчасти же на границе средней и нижней третьи большой берцовой кости. В случае высокой ампутации, крыса, ввиду короткой культи, при хождении не могла на нее опираться и, следовательно, внешняя сила не могла оказать действия. Вследствие того, что ампутация была проведена в данном случае в середине бедренной кости, то есть далеко как от дистального так и от расположенного ближе к центру эпифизарных хрящей то и действующие в окрестности эпифизарных хрящей химические и биологические силы также не могли проявлять свои действия.

Благодаря этому, в случае высокой ампутации ни в одном случае не было обнаружено образование хряща.

В случае же проведения низкой ампутации, то есть на границе нижней и средней третьи большой берцевой кости, эти животные по истечении 3–4 дней после вмешательства, пользовались своими оперированными конечностями для опирания во время хождения, вследствие чего на конце культи воздействовало внешнее давление. На 18 животных, у которых была проведена низкая ампутация, (9 взрослых и 9 молодых) в 80% случаев произошло образование хряша, в доказательство того, что внешние силы (давление, напряжение), то есть функция, решающим образом воздействуют на качество восстановления.

Этот результат подкрепляется также на основании контрольных опытов автора, при которых у 6 крыс была проведена низкая ампутация, и ампутированные конечности зашивались под кожу живота по всей их длине. В этих контрольных опытах, ни в одном случае не произошло образования хряща, в противоположность другим опытам с 80% образованием хряща.

Результаты опытов автора означают прогресс по сравнению с подобными экспериментами Лакруа и Шелье, главным образом из трех точек зрения, а именно в отношении

1. методики ампутации
2. возраста подопытных животных и
3. оценки полученных результатов.

1. Шелье производил свои ампутации совсем вблизи эпифзарного хряща, или же проводил отслойку дистального эпифизарного хряща. Лакруа же, или Тёк (Teucq) производили ампутации на расстоянии 2 мм от дистального эпифизариого хряща бедренной кости. В противоположность этому автор проводил высокую и ннизкую ампутации в обоих случаях далеко от эпифизарного хряща.

2. Шелье и Лакруа или же Тёк оперировали только совсем молодых (12 дневных) крыс, так как по их мнению у более старых крыс образование хряща не состоится; в противоположность этому автор оперировал 3–4-недельных «молодых», или же 2-месячных или старших «взрослых» крыс, и получил в результате низкой ампутации образование хряща не только на молодых, но и на взрослых корысах.

3. В то время как Лакруа, или же Тёк приписали восстановление направленное на образование хряща, исключительно присутствию внутренних и биологических сил, то автор с неопровержимой достоверностью доказал тот хорошо известный иа литературы факт, что наряду с внутренними силами и внешние силы (давление, растяжение, напряжение и т. д.), то есть функция, решающим образом воздействуют на восстановление.

EXPERIMENTS INFLUENCING THE QUALITY OF THE TISSUE OF THE AMPUTATION STUMP

L. Balázsy

Experiments have been conducted with a view to prove that environmental forces, i. e. pressure and function have a decisive role in the development of the quality of the regeneration tissue, in the present case in that of the amputation stump.

Forty-seven rats have been operated, partly high up in the median part of the femur and partly deep on the border of the median and lower third of the tibia. In cases of high amputation the rat — owing to the insufficient length of the stump — could not rest on its stump when walking, thus outside forces could not assert themselves and seeing that in this case the amputation had been made far from both the distal and the proximal epiphyseal cartilage, the biological and chemical factors acting in the environment of the epiphyseal cartilage could not prevail either. Consequently in cases of high amputation, cartilage formation was never obtained.

In deep amputation the ablation of the limb was performed on the border of the lower and median third of the tibia. 3 to 4 days following operation these animals — while walking —

were supported by the limbs amputated in this manner and, owing to this fact, an outside pressure was exerted on the stump-end. Out of the 18 deepamputated animals (9 of them were adults and 9 young) cartilage formation occurred in 80 per cent of the cases, proving that outside forces (pressure, stress) viz. the function influence decisively the quality of regeneration.

These findings are confirmed by control experiments in which 6 rats were operated and their limbs sewn in their full length under the abdominal skin ; at variance with the former groupe where in 80 per cent of the cases cartilage was found, here cartilage did never form.

In comparison with the experiments of similar character of Lacroix and Selye our experiments indicate progress in respect of three points :

1. The mode of amputation,
2. the age of the animals used in the experiments, and
3. the explanation of the results obtained.

ad. 1. SELYE amputated quite close to the epiphyseal cartilage or decorticated the distal epiphyseal cartilage, whereas LACROIX and TEUCQ respectively performed the amputation 2 mm from the distal epiphyseal cartilage of the femur ; we, on the other hand performed high — and deep — amputation far from the epiphyseal cartilage.

ad. 2. SELYE and LACROIX as well as TEUCQ operated only quite young (12 day-old) rats, because they contended that no cartilage formation occurred on older rats, whereas we operated 3 to 4 week-old «young» rats and 2 month-old, or older «adult» ones ; in the case of deep-amputation cartilage formation was found in both young and adult rats.

ad. 3. While LACROIX and TEUCQ respectively attributed the regeneration exylusively to the presence of internal chemical and biological factors, our experiments confirmed with irrefutable certitude the fact, well known from literature, that along with the internal factors external forces (pressure, stretching, stress etc.) i. e. function, decisively influence regeneration.

LÁSZLÓ BALÁZSY, Debrecen, 12. Anatómia, Ungarn.

BIOLOGISCHE BEOBACHTUNGEN IM ZUSAMMENHANGE MIT DER KÜNSTLICHEN ZÜCHTUNG VON FISCHEN

E. WOYNÁROVICH

FORSCHUNGSINSTITUT FÜR FISCHZUCHT, BUDAPEST (VORSTAND: P. ERŐS)

(Eingegangen: 9. Jan. 1955)

Zusammenfassung

Der Autor bespricht die morphologischen und biologischen Beobachtungen, die im Laufe der künstlichen Züchtung von Nutzfischen (Hecht, *Esox lucius*, — Zander, *Lucioperca lucioperca* L., — Karpfen, *Cyprinus carpio* L . — Weissfische, *Abramis*. — Wels, *Siluris glanis*, usw.) gesammelt wurden. Er beschäftigt sich auch mit der Frage der Klebrigkeit des Rogens und beschreibt das Verhalten des nicht befruchteten Zanderrogens, welcher innerhalb von 24 Stunden die Eierhülle verlässt. Weiters erklärt der Autor die entgegengesetzte Wirkung der Temperatur und des Sauerstoffgehalts auf die Entwicklung. Er beschreibt das oftmals zu beobachtende Absterben der Brassen im Balatoner See während der Laichzeit, beschäftigt sich mit der Atmung der verschiedenen Fischlarven und gibt schliesslich eine Beschreibung der äusseren Kieme des *Proterorhinus marmoratus* PALLAS.

In der künstlichen Beeinflussung der Fortpflanzung der Fische ist eine praktische wirtschaftliche Aufgabe des nach Mehrproduktion strebenden Menschen zu sehen. Während dieser Arbeit tauchen jedoch oftmals Probleme theoretischer Art auf, bei deren Untersuchung der Forscher nicht umhin kann, eine völlige Klärung derselben anzustreben.

In Ungarn ist — ausgenommen die künstliche Züchtung der Forelle und die sozusagen halbkünstliche des Zanders — die Frage der betriebsmässigen künstlichen Züchtung von mehreren unserer Nutzfische nur seit dem Jahre 1947 aktuell. Neben der künstlichen Züchtung des Hechtes (*Esox lucius* L.), des Zanders (*Lucioperca lucioperca* L.), des Karpfens (*Cyprinus carpio* L.) des Wels (*Siluris glanis* L.) sowie des Störs (*Acipenser ruthenus* L.) bestand die Möglichkeit, sich auch mit der Frage der Züchtung von Weissfischen, mit der der Schleie (*Tinca tinca* L.), der Ziege (*Pelecus cultratus* L.) und der Quappe (*Lota lota* L.) zu beschäftigen. Es besteht nunmehr der Wunsch, über alle derartige im Laufe der Jahre gesammelten Beobachtungen und Untersuchungen zu berichten, durch welche die betriebsmässige Züchtung im wesentlichen zwar nicht berührt wurde, die aber demnoch mit dieser in einem mehr oder weniger intensiven Zusammenhang steht.

Weit verbreitet ist die Neigung, in der künstlichen Züchtung der Fische nur eine überhebliche und meistens eine jede wirtschaftliche Zielsetzung entbehrende Tätigkeit der Menschen zu sehen, der sich in alles einzumengen bereit ist. Unsere Untersuchungen im Zusammenhange mit der stadiellen Entwicklung

der Fische gestatten uns, in dieser Frage den richtigen Standpunkt einzunehmen [11]. Der Erfolg einer künstlichen Fischzüchtung wird in erster Reihe dadurch entschieden, ob es gelingt — im Vergleiche zur natürlichen Vermehrung —, den Fortbestand, also die zahlenmässige Zunahme der Fischindividuen, in bedeutendem Masse zu erhöhen. Die Möglichkeit des Fortbestandes ist nämlich in den einander folgenden Lebensperioden der zarten Fischbrut sehr starken Schwankungen unterworfen, doch im allgemeinen ist diese Möglichkeit in den ersten Lebensstadien unverhältnismässig geringer, da sich die Fähigkeit der entstehenden Brut: Gefahren abwenden, beziehungsweise diese vermeiden zu können, mit wachsender Körpergrosse steigert, so dass sich die den Fortbestand gefährdenden Faktoren nacheinander ausschalten. Bei der Untersuchung, von welchen Umständen diese Faktoren abhängen, resp. welche Faktoren die Grösse der Gefährdung beeinflussen, konnte festgestellt werden, dass dies von den Eigenarten der Umgebung und von den Eigenschaften des Individuums abhängt. Die meisten Fischarten sind in ihrer ersten Lebensperiode — innerhalb der Eierhülle — zur Gänze, und in ihrer zweiten — der Larvenperiode — in sehr grossem Masse den Gefahren ihrer Umgebung ausgesetzt. Ihre individuellen Eigenschaften, wie z. B. die Bereitschaft Gefahren zu spüren, sich vor ihnen zu flüchten, sind noch nicht in dem Masse entwickelt, um gegen die Einwirkungen der Umwelt eine entsprechende Gegenwirkung ausüben zu können. Das an der Unterlage anhaftende Fischei oder die die Einwirkungen der Umwelt kaum wahrnehmende Fischlarve sind — ersteres vollkommen, letzteres in grossem Masse — den schützenden oder zerstörenden Einflüssen der Umwelt ausgesetzt. Es besteht keine Möglichkeit für sie, die Schutzwirkung durch einen individuellen, instinktiven Entschluss auszunützen, oder den zerstörenden Einfluss zu vermeiden.

Beobachtungen bestätigten in vollem Masse die Richtigkeit obiger Feststellungen. WUNDER [16] stellte als erster die Tatsache fest, dass das Mass des für die verschiedenen Fischarten charakteristischen Schutzes für die befruchteten Eier und für die Brut, mit der während einer jeden einzelnen Befruchtungsperiode im Eierstock sich entwickelnden Eierzahl in enger Korrelation steht. Je vollkommener die von seiten der Elterntiere für den Schutz des abgelegten Eier sowie der Brut getroffenen Massnahmen sind, um so weniger Rogen entwickelt sich im Eierstock und umgekehrt. Jene Fischarten, die viel Rogen zur Reife bringen, überlassen den abgelegten Eier seinem Schicksal. Aus all dem geht klar hervor, dass bei den verschiedenen Fischarten, im Interesse einer erfolgreichen Fortpflanzung, zwecks Paralysierung der im Ei- und Larvenstadium bestehenden äusserst grossen Gefährdung, die Betreuung des Eies und der Brut in verschiedenem Masse vor sich geht. Der Sinn der menschlichen Einwirkung ist darin zu sehen, dass der Mensch im Laufe der künstlichen Züchtung die Aufgabe der Ei- und Brutbetreuung selbst in die Hand nimmt, weil diese Betreuung bei den einzelnen Arten der Nutzfische überhaupt nicht, oder nur

in recht geringem Masse vorhanden ist. Je mehr wir der Brut behilflich sind, die meist gefährdete Periode des Lebens zu überstehen, um so grösser ist die Wahrscheinlichkeit, dass in dem nunmehr folgenden, noch immer sehr viele Gefahren in sich bergenden selbständigen Leben, mehrere Fischindividuen weiter bestehen.

In dem Eierstock der Fische zeigt sich die Entwicklung des Rogens teils in einem Anwachsen, teils in einer Reduktionsteilung. Zwischen der Dauer der im Eierstock vor sich gehenden Eientwicklung und der Temperatur der Umgebung ist ein enger Zusammenhang zu erkennen. Die VAN'T HOFF'sche R. G. T. Regel hat auch hier Gültigkeit. Die Temperatur der Umgebung, resp. deren Einwirkung, tritt in der Beschleunigung der in dem Eierstock oder im Rogen der verschiedenen Fischarten vor sich gehenden Entwicklung nicht gleichmässig zutage. Je nachdem, ob der Fisch kalt oder warm stenotherm gearteт ist, übt ein und dieselbe Temperatur eine andere Wirkung auf die Entwicklung aus. So wird z. B. bei 15° Celsius die Entwicklung des Forelleneies auf maximale Geschwindigkeit gesteigert, die Entwicklung des Karpfeneies hingegen ist, bei derselben Temperatur, noch recht langsam, die des Zandereies gerade von optimaler Geschwindigkeit. Der Lebensrhythmus einer jeden Fischart ist mit Hilfe einer hyperbolaförmigen Kurve graphisch darstellbar, in welcher der optimale, maximale oder minimale Lebensrhythmus der in Frage stehenden Fischart jeweils mit einem anderen Temperaturstreifen eingezeichnet ist. Unsere Untersuchungen bezwecken, die Lebensrhythmuskurve der einzelnen Fischarten mit Hilfe verschieden gearteter Untersuchungen zu bestimmen.

Der im Eierstock vor sich gehende Prozess der Eientwicklung kann nach unseren Untersuchungen [14] in zwei Entwicklungsperioden eingeteilt werden. Die erste ist auf eine automatische — im Rhythmus von der Temperatur regulierte —, die zweite auf eine hormonale Wirkung zurückzuführen. Das Endresultat der im Eierstock vor sich gehenden Eientwicklung ist der zur Befruchtung reife Rogen, welcher dem SUWOROW'schen [9], fünftem Entwicklungsstadium entspricht. Bis zum 4. Entwicklungsstadium ist die Entwicklung des Rogens eine automatische und von der Temperatur regulierte. Sobald der Rogen dieses Entwicklungsstadium erreicht hat, übt er — auf eine bis heute noch nicht geklärte Weise — jene Wirkung auf das Muttertier aus, welche sich in der Suche und Vorbereitung der Laichstelle äussert. Der Aufenthaltsort zahlreicher Fischarten liegt weit von der Laichstelle entfernt. In diesen Fischen erweckt der im 4. Entwicklungsstadium befindliche Rogen jenen unwiderstehlichen Wandertrieb, der den Fisch über unzählige Hindernisse und Gefahren hinweg zur Laichstelle treibt. Die an der Laichstelle appercipierten Eindrücke der Umgebung üben mit Vermittlung der Siunesorgane — den PAWLOW'schen bedingten Reflexen entsprechend — eine Wirkung auf die Hypophyse aus und bringen diese in Funktion. Das Gonadotrophormon der Hypo-

physe gelangt im Wege des Blutkreislaufs in den Eierstock und löst hier die Reduktionsteilung des Eies aus, womit dann der Übergang aus dem 4. in das 5. Entwicklungsstadium vollzogen ist. Die morphologischen und physiologischen Einzelheiten darüber, wie diese Reduktionsteilung geschieht, sind uns aus der neueren Literatur noch nicht bekannt.

An dem aus dem Eierstock fast von selbst herausfliessenden plastischen Rogen (Tafel I, Abb. 1). kann selbst mit Hilfe eines Mikroskops keine Struktur unterschieden werden. Ähnlicherweise ist auch nicht festzustellen, auf welche Weise sich der Eikern zu der auf der Eierhülle befindlichen kleinen Öffnung, zum Mikropyle orientiert. — LINDROTH [7] vertritt die Ansicht, dass zwischen dem Mikropyle und dem Eikern ein durch die Lage bedingter Zusammenhang besteht. Das Mikropyle ist am besten am Rogen der Karpfenartige zu beobachten. Anfänglich hat es hier einen Durchmesser von ungefähr 0·05-0.1 mm, ist trichterförmig und verbindet die Aussenwelt mit der Eizelle. Nach Lindroth hat die untere Öffnung des Mikropyles beim Hechtrogen einen Durchmesser von 3 μ, wodurch verhindert wird, dass durch diese Öffnung gleichzeitig mehrere Spermatozoiden in den Eikern eindringen können. Mit der fortschreitenden Schwellung des Rogens wird das Mikropyle innerhalb kurzer Zeit immer kleiner und verschwindet schliesslich spurlos.

Der plastische strukturlose Rogen wird, sobald er ins Wasser gelangt, in kurzer Zeit kugelförmig (Tafel I, Abb. 2 und 3). Bei Fischen, die in kühlem Wasser laichen (Hecht, Zander) kann es auch 1—2 Stunden lang dauern, bis die Polarisation des Eies (die Ausbildung der animalen und vegetativen Pole) beendigt ist und die Teilung beginnt (Tafel I. Abb. 4 und Tafel III, Abb. 3).

Der ins Wasser gelangte Ei schwillt einesteils an, anderteils bildet sich auf seiner Oberfläche ein Klebstoff. Die Schwellung erstreckt sich eigentlich nur auf die Eierhülle (Zona radiata) ; indem — auf Diffusionswege — in dem Raum zwischen Kernteil und Hülle Wasser eindringt, welches den dort befindlichen eiweissartigen Stoff verdünnt. Dadurch entsteht der sogenannte perivitellinäre Raum, in welchem — im Falle des Zandereies — eine faserige Struktur bereits mit geringer Vergrösserung zu erkennen ist. In dem perivitellinären Raum ist Platz für die Ausbildung des animalen Pols.

Das Ausmass der Schwellung kann bei den einzelnen Fischarten verschieden sein. Am stärksten schwillt der Rogen der Ziege (Tafel IV, Abb. 4), dessen Durchmesser — im Augenblick, da er ins Wasser gelangt — 1,5 mm beträgt, um später auf 4—5 mm anzuschwellen. Diese hochgradige Schwellung des Ziegerogens versetzt diesen in einen halbschwebenden Zustand, so dass bereits die geringste Wasserströmung das am Grunde liegende Ei mit sich reisst und in der Wassermenge schweben lässt. Eine ähnliche Schwellung, doch eine geringere Schwebefähigkeit weist auch das Ei des *Proterorhinus marmoratus* PALL. auf. An der Oberfläche des Ziegerogens sondert sich kein Klebestoff ab. Sehr

wenig Klebestoff ist auch am Ei des *Proterorhinus marmoratus* PALL. zu finden.

Bei solchen Fischen, deren Rogen an der Unterlage anhaftet, wird der perivitellinäre Raum infolge der Schwellung nicht so gross. Im allgemeinen schwillt dieser Ei auf doppelten Kubikinhalt an. Auf der Hülle des aus dem Muttertier gelangenden, zur Befruchtung reifen Eies befindet sich unter dem Mikropyle jener Teil des Eikerns, aus welchem sich — im Wasser — während der Schwellungsperiode der animale Pol entwickelt. Zu diesem Zeitpunkte besteht also zwischen dem Kernteil und dem Mikropyle ein ganz bestimmter, durch die Lage bedingter Zusammenhang, der mit Beendigung der Schwellung aufhört. Der Eikern besitzt die Fähigkeit seine Lage innerhalb der Eierhülle zu verändern. In dem Kernteil des Eies basiert diese Veränderung der Lage (Rotation) auf der Verschiedenheit des spezifischen Gewichtes der verschiedenen Kernteile. Gut zu beobachten ist dies am Zanderei, wo die innerhalb des Kernteils befindliche Fettkugel stets den höchsten Punkt einnimmt (Tafel III, Abb. 2—6). Mit der fortschreitenden Entwicklung des Embryos kann an Stelle der passiven Bewegung die aktive Bewegung des Embryos beobachtet werden.

Im Zusammenhang mit der Klebrigkeit des Rogens ergaben sich viele noch unerforschte Probleme. Der klebrige Stoff zeigt sich auf der Oberfläche der Eierhülle. Unserer Ansicht nach, kann es sich um einen eiweissartigen Klebestoff kolloider Natur handeln. An der Oberfläche des frisch ins Wasser gelangten Zandereies sind kleine hakenartige Erhöhungen festzustellen. Von der Oberfläche des in Formalin gelegten Bleirogens löst sich der Klebestoff ab. Die Klebrigkeit des sich an der Oberfläche des Rogens abgesonderten Klebestoffes ist bei den verschiedenen Fischarten nicht gleich. Am besten klebt der Rogen von Karpfenarten. Ähnlich verhält es sich auch mit dem Zander- und Welsrogen. Die Klebrigkeit des Hechtrogens ist ganz gering, der Klebestoff kann mit Wasser abgewaschen werden.

Über den Rogen der Quappe war die Ansicht verbreitet, dass dieser — ähnlich dem Rogen der nahe verwandten, im Meere lebenden Stockfische — schwebender und nicht klebriger Natur ist. Es gelang uns im Laufe der künstlichen Befruchtung des Quappeneies gerade das Gegenteil zu beweisen.

Bei den Karpfenarten besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Klebrigkeit und der Überreife des Rogens. Der im Eierstock zurückgebliebene (oder künstlich zurückgehaltene) Karpfenrogen verliert mit dem fortschreitenden Prozess der Überreife allmählich auch seine Klebrigkeit. (Durch die Überreife wird auch die Befruchtung insoferne beeinflusst, dass der über einen gewissen Grad hinaus gelangte Ei zur Befruchtung nicht mehr fähig ist). Der im Eierstock angeschwollene, überreife Rogen wird überhaupt nicht klebrig. Auch der noch nicht reife Rogen sondert keinen Klebestoff ab. Die Klärung des zwischen der Klebrigkeit und dem Reifungsprozess bestehenden engen

Zusammenhangs verspricht eine recht interessante Aufgabe zu werden.

Im Wasser hört die Klebrigkeit des Rogens nach einer gewissen Zeit auf. Wenn also z. B. das an der Unterlage anhaftende Karpfenei eine Stunde nach der Befruchtung losgelöst wird, kann es neuerdings nicht wieder angeklebt werden. Die Dauerhaftigkeit des Klebestoffes nimmt im Laufe der fortschreitenden Entwicklung in grossen Masse ab. Das Karpfenei kann eine Stunde nach der Befruchtung nur sehr schwer ohne Beschädigung von der Unterlage gelöst werden. Hingegen kann dies — auch ohne Gefährdung der Unversehrtheit des Eies — drei Stunden später leicht durchgeführt werden. Die Tatsache der Klebrigkeit und die Befruchtung selbst stehen in keinem Zusammenhang miteinander. Der Rogen kann unbefruchtet ebenso klebrig sein, wie der befruchtete.

Der von der Septen des Eierstocks losgelöste und in der Eierstockhöhle angesammelte, zur Befruchtung reife Rogen fliesst fast von selbst aus dem Muttertier, wenn man es aus dem Wasser nimmt. Diese Erscheinung konnte bei unseren Karpfen-, Schleie-, Weissfisch-, Zander-, Hecht-, und Quappenexemplaren beobachtet werden [14]. Bei anderen Fischarten verhindert der kreisrunde Schliessmuskel der Geschlechtsöffnung das Ausfliessen des Rogens. Das Mass der Kontraktion des Schliessmuskels ändert sich jeweils bei den verschiedenen Individuen der in Frage stehenden Fischart. Dies steht wahrscheinlich mit einer Nerveneinwirkung im Zusammenhang. Es wurden z. B. solche Stör- und Welsexemplare angetroffen, bei denen infolge der Kontraktion des Schliessmuskels der zur Befruchtung reife Rogen nicht ausstreifen werden konnte, während andere Exemplare denselben reichlich ausfliessen liessen.

Im allgemein funktioniert der Schliessmuskel der Geschlechtsöffnung bei männlichen Tieren besser, als bei weiblichen. Deshalb ist es recht umständlich, das Sperma, die Milch, von männlichen Hecht, in grösseren Mengen abzustreifen. Wenn es sich also um eine solche Fischart handelte, wurde auch die Anwendung von krampflösenden Mitteln in Erwägung gezogen.

Bezüglich der Morphologie, Bewegung und Quantität der in der Fischmilch befindlichen Spermien sind auch in der Literatur Angaben zu finden. SCHLENK und KAHMANN [10] fanden in 1 ml Forellenmilch 10 Milliarden Spermien. LINDROTH [7] bestimmte den Gehalt an Spermien in 1 ml Hechtmilch mit mehr, als 20 Milliarden. Diese Zahl bedeutet, dass wenn man einen Tropfen, also 0,1 ml Hechtmilch, in 1 Liter Wasser legt, auf jeden Kubikmillimeter desselben 2000 Spermien fallen. In der aus der Geschlechtsöffnung ausfliessenden Fischmilch sind die Spermien unbeweglich, ihre Bewegung beginnt erst nach der mit Wasser erfolgten Verdünnung. Das Wasser spornt also — als natürlicher irritierender Faktor — die Spermien zur Bewegung an. Der pH- und Salzgehalt des Wassers, sowie die Temperatur desselben beeinflussen die Bewegung der Spermien ; diesbezüglich sind uns jedoch keine umfassend gründlichen Untersuchung bekannt. Nach ADOLPHI [1] vollführen die Spermien eine

kreisrunde Bewegung. Über eine Rheotaxis verfügen die Spermien nicht. Einzelne Forscher sind geneigt, in dem Eintreffen der Spermien bei dem Mikropyle eine Chemotaxis zu sehen. Die zahlenmässige Grösse der Spermien lässt jedoch darauf schliessen, dass diese im allgemeinen nicht nötig ist, sondern eher thigmotaxische Erscheinungen beim Ankommen der Spermien zum Rogen zur Geltung gelangen können, was auch unter dem Mikroskop zu beobachten ist. Es war nämlich überall auf der Oberfläche des Rogens ein dicker, aus dicht nebeneinander liegenden Spermien bestehender «Pelz» festzustellen.

Die Befruchtungsfähigkeit des Fischspermas steht in engem Zusammenhang mit seiner Bewegungsfähigkeit. Das sich nicht mehr bewegende Spermium ist zur Befruchtung unfähig. Der Zeitraum der Bewegung der Spermien ändert sich bei den verschiedenen Fischarten. Das gibt für jede Fischart eine charakteristische, der Temperatur entsprechende Zahl. Die diesbezüglichen Untersuchungen von LINDROTH [7] bestätigen unsere Annahme, wonach die Gesetzmässigkeit des mit der Temperatur variierenden Lebensrhythmus auch für die Spermien Gültigkeit hat. Nach ADOLPHI [1] legt das Fischspermium per Sekunde einen Weg von 50 μ zurück. Wenn wir bei 20° Celsius als Lebensdauer des Spermiums (im Falle der Forelle) 50 Sekunden annehmen, ergeben sich 2—3 mm. Die Spermien der einzelnen Fischarten haben verschiedene Lebensdauer. Diese beträgt bei den Forellen 50 Sekunden. Das Spermium des Hechtes lebt 3—4 Minuten, des Karpfens 5 Minuten.

Nach der Schwellung der Eierhülle und nach Beendigung der Polarisation, beginnt sich der animale Pol zu teilen (Tafel I, Abb. 4 und Tafel III, Abb. 3). Bei den Knochenfischen teilt sich nur der animale Pol. Bei den Ganoidei (z. B. bei dem Sterlet) erstreckt sich die Teilung des Rogens auf den ganzen Kernteil. Die morphologische Abgrenzung der sich im Laufe der Teilung gebildeten Zellen ist bei den einzelnen Fischarten verschieden. Die bei der Furchung des Zanderrogens entstandenen 2—4—8 Zellen trennen sich fast gänzlich voneinander. Hingegen schmiegen sich die in einem ähnlichen Entwicklungsstadium befindlichen Zellen des Hechtrogens aneinander an. Gut abzugrenzen sind auch die sich teilenden Zellen des Karpfen- und Bleirogens. Der zur Befruchtung reife, aber nicht befruchtete Rogen schwillt — sobald er ins Wasser gelangt — an und polarisiert genau so, wie der befruchtete. Die gleichmässige Teilung des animalen Pols setzt jedoch nicht ein. Der animale Pol des nicht befruchteten Hecht- und Karpfenrogens bleibt mit fortschreitender zeit nicht unverändert, sondern kann sich recht verschieden verhalten. Entweder löst er sich von dem vegetativen Teil ab, oder er teilt sich unregelmässig, oder es lösen sich von ihm kleinere und grössere kugelförmige Teile ab. Die Frage nun, ob diese animalen Polteile als «Zellen» bezeichnet werden können oder nicht, müsste mit histologischen Untersuchungen entschieden werden.

Sehr eigenartig ist das Verhalten des nicht befruchteten Zanderrogens. Der animale Pol desselben spitzt sich mit fortschreitender Zeit allmählich zu

(ungefähr innerhalb von 16 Stunden bei 10° Celsius) (Tafel III, Abb. 6), bis die befruchteten Zellen das 32-Zellen Stadium überschreiten. Dann beginnt an der runden — eventuell mit dem Mikropyle identischen — Öffnung der Eierhülle die Ausstülpung des Kernteils aus der Eierhülle. Zuerst verlässt der animale Teil die Hülle und zuletzt die Fettkugel (Tafel IV, Abb. 1). Der Kernteil verbleibt in der hauchdünnen zweiten Eierhülle. Sobald sich der Kernteil gänzlich von der Eierhülle befreit hat, erhebt er sich auf die Oberfläche des Wassers (Tafel IV, Abb. 3), doch nun liegt bereits die Fettkugel zuoberst. Diese Wanderung des Kernteils wurde sehr oft beobachtet, sowohl an dem im Laufe der künstlichen Befruchtung aus irgendeinem Grunde unbefruchtet gebliebenen als auch an dem von den natürlichen Laichstellen eingebrachten unbefruchteten Rogen. Aus der Tatsache, dass sich der nicht befruchtete Eigehalt auf diese Weise entleert, ergibt sich ein grosser Vorteil für die übrigen befruchteten Eier. Zwischen den Eiklumpen bleibt nämlich nicht ein einziger bestehen, der mit der Zeit in Fäulnis übergehen und im verschimmelten Zustand auch die gesunden Eier gefährden könnte (Tafel IV, Abb. 2). Zu Beginn der Zanderlaichzeit erreichen viele solche Nester die Brutanlage, in welchen sich zahlreiche unbefruchtete Eier befinden, ja manchmal wurden auch solche Zandernester eingebracht, in denen nicht ein einziges befruchtetes Ei vorhanden war. Der im Brutbassin über diesen Nestern auf der Oberfläche des Wassers schwimmende Eigehalt deutet auf die Erfolglosigkeit der Befruchtung (Tafel IV, Abb. 3).

Wie bereits in mehreren Arbeiten hervorgehoben wurde [12, 13, 14, 15], hängt das Entwicklungstempo des Fischrogens von der Temperatur und von der Menge des zur Verfügung stehenden Sauerstoffes ab. Die Temperatur beeinflusst im Sinne der VAN'T HOFF 'schen R. G. T. Regel die Entwicklungsgeschwindigkeit des Fischeies. Die Eientwicklung der verschiedenen Fischarten wird durch die Tempertur nicht in gleichem Masse beeinflusst. LINDROTH [7] veröffentlicht diesbezüglich wertvolle Angaben. Nach unserer, auch durch orientierende Versuche bestätigten Annahme, steht die Entwicklung des Eies und der Larve in engem Zusammenhang mit dem für die einzelnen Fischarten charakteristischen Lebensrhythmus. Die Sauerstoffmenge übt nämlich, wenn sie für den der gegebenen Temperatur entsprechenden Entwicklungsrhythmus nicht ausreicht, eher eine hemmende Wirkung aus. Dies ist gut zu beobachten, wenn die Eierhüllen von diesem Standpunkte aus untersucht werden. Je mehr wir uns dem Inneren der Eiklumpen nähern, wo die Sauerstoffverhälnisse stets ungünstiger sind, als an der Oberfläche, um so mehr sind Eier anzutreffen in der Entwicklung allmählich zurückbleiben. Dieser Umstand kann ausschliesslich mit den ungünstigen Sauerstoffverhältnissen erklärt werden.

Mit dem Ansteigen der Temperatur erhöht sich der Sauerstoffbedarf des im selben Entwicklungsstadium befindlichen Fischeis in bedeutendem Masse. Hingegen kann das wärmere Wasser nur weniger Sauerstoff auflösen, als das kältere. Aus dem eben Gesagten ergibt sich die Erklärung jener längst gemachten

Beobachtung, wonach nur künstlichen Erbrütung des Eies einer jeden einzelnen Fischart, bestimmte Temperaturgrenzen die optimale Entwicklung sichern. Der Hechtrogen z. B. entwickelt sich bei 7—12° Celsius am günstigsten, der Rogen des Zanders bei 9—15° Celsius und jener des Karpfens bei 18—21° Celsius. In Wasser, deren Temperatur höher ist als die oben angeführten Temperaturen, kann sich der Rogen im allgemeinen nicht entsprechend entwickeln und es besteht die Möglichkeit, dass ein Grossteil zugrunde geht. Kann aber der Sauerstoffbedarf des Rogens der erhöhten Temperatur entsprechend befriedigt werden, falls er z.B. mit Wasser Bestäubung zur Reife gebracht wird [12, 14], dann geht die Entwicklung auch bei höherer Temperatur auf normale Weise vor sich und die Lebensfähigkeit der geschlüpften Larven zeigt ebenfalls nicht die geringste Einschränkung.

Die von der Temperatur und dem Sauerstoffgehalt auf die Eientwicklung ausgeübte Wirkung entgegengesetzter Richtung, verursacht in den Anlagen für künstliche Erbütung öfters bedeutenden Schaden.

Über den mit steigender Temperatur wechselnden Sauerstoffbedarf geben die Untersuchungen von LINDROTH [7] genaue Auskunft. Der Sauerstoffbedarf des ungefähr in der Mitte der embryonalen Entwicklung befindlichen Hechtrogens (Tafel I, Abb. 9—10) beträgt per Stück bei 5° Celsius 0,00024, bei 14° Celsius 0,00050, bei 17° Celsius 0,00057, und bei 23° Celsius 0,00080 cm^3 per Stunde. Zur selben Zeit beansprucht der im 4. Entwicklungsstadium befindliche Rogen bei 12° Celsius insgesamt nur 0,00006 cm^3 Sauerstoff pro Stunde.

Eine Bestimmung der einzelnen Perioden der Eientwicklung erwies sich in der Praxis darum notwendig, weil nicht nur der Umstand festzustellen war, wie weit der Ei in der Entwicklung hält, sondern wie viel Zeit im Falle der bekannten Temperatur noch nötig ist um das zur Schlüpfung reife Stadium zu erreichen. Die aufeinander folgenden Entwicklungsperioden sind bei den verschiedenen Knochenfischen gleichmässig gut zu beobachten (Tafel I, II, III).

Im Laufe der künstlichen Züchtung des Hechtes wurden sehr oft missgebildete Exemplare mit zwei Köpfen oder zwei Schwänzen angetroffen (Tafel VI, Abb. 5—7).

Die Ausbildung von echten Zwillingen in dem Ei von Knochenfischen ist darum ausgeschlossen, weil sich aus der Bauchhöhlenwand, die aus den das sich nicht teilende Dotter umgebenden Zellen entstanden ist, auf jeden Fall nur ein Exemplar entwickeln kann, auch dann, wenn sich der animale Teil des Rogens völlig entzweiteilen und zwei gleiche Körperteile enstehen würden. Es wurden oft Exemplare mit zwei Köpfen angetroffen, die zwei Herzhöhlen und Herzen hatten (Tafel VI, Abb. 5—6). Die Herzen zeigten im allgemeinen eine synkrone Funktion, doch in den meisten Fällen degenerierte im späteren Stadium der Larvenentwicklung allmählich einer der beiden völlig gleich erscheinenden Körperteile. Manchal wird auch eine Hechtlarve angetroffen, die nur einen aus einer amorphen Zellenhäufung bestehenden Zwillingteil hat (Tafel VI, Abb. 7).

Es gelang uns niemals Missbildungen am Leben zu erhalten, selbst wenn sie mit der grössten Sorgfalt betreut wurden. Bei den übrigen Fischarten ist diese Erscheinung nur selten zu beobachten: unter mehreren Tausend künstlich befruchteten Karpfen wurde kein einziges derartiges Exemplar angetroffen. Auch aus Teichwirtschaften wurde nur ein einziges Mal ein entwickeltes Karpfenexemplar eingebracht, welches eine gabelartig verzweigende Wirbelsäule und zwei Schwänze hatte.

Beachtenswert ist die Empfindlichkeit des Rogens gegenüber einer während der Keimentwicklung erfolgten Erschütterung. Infolge heftiger Bewegung oder Erschütterung wird der animale Pol beschädigt und der Rogen geht zugrunde. Die geringfügige Schrumpfung der Eierhülle — z. B. während des Transportes — ist in der Periode der Keimentwicklung (vor der Schliessung des Blastoporus) viel schädlicher als im Stadium der embryonalen Entwicklung. Die Schliessung des Blastoporus und damit die Beendigung der Keimentwicklung und der Anfang der embryonalen Entwicklung bedeuten vom Standpunkte der Empfindlichkeit und der Transportfähigkeit einen Markstein für die Eier der meisten Fische. Die Ausbildung der Organe des Fischembryos schliesst noch viele ungelöste Fragen in sich, mit welchen wir uns bisher noch nicht eingehender beschäftigen konnten.

Das Endresultat der im Ei vor sich gehenden Entwicklung bedeutet das zum Schlüpfen reife Embryo (Tafel IV, Abb. 5). Zwischen der Erreichung des zum Schlüpfen reifen Stadiums und dem Schlüpfen selbst (das Verlassen der Eierhülle) besteht kein gesetzmässiger Zusammenhang. Das zum Schlüpfen reife Embryo schlüpft also nicht unbedingt sofort, wenn das entsprechende Entwicklungsstadium erreicht ist. Dieser Umstand findet darin seine Erklärung, dass dem Verlassen der Eierhülle die Lösung der Hülle vorangehen muss. Die Erzeugung des hüllenlösenden Stoffes wird von der Temperatur in einem anderen Masse beeinflusst, als die Entwicklung des Embryos. Die Erzeugung des hüllenlösenden Stoffes verläuft nicht synkron mit der Entwicklung des Embryos. Mit hoher Temperatur kann ein frühzeitiges, mit niedriger Temperatur ein verspätetes Schlüpfen erreicht werden. Die Art und Weise, wie die Erzeugung des hüllenlösenden Stoffes erfolgt, ist uns aus der Arbeit von GRAY [6] bekannt. Die Tatsache der Hüllenlösung kann im Falle des Karpfens (Tafel V, Abb. 5—6), des Zanders, des Barsches und des Welses gut beobachtet werden. Unter Einwirkung des hüllenlösenden Enzims verdünnt sich die Hülle (Hecht, Karpfen, Bleiarten) oder die innere Hüllenschichte löst sich vollkommen auf (Zander, Wels) oder es bildet sich auf derselben eine runde Öffnung (Barsch). Auf dem zum Schlüpfen reifen Barschei ist bereits jene Öffnung vorhanden, durch welche die Barschlarve später dasselbe verlässt. Diese Beobachtung ist ein Beweis für die Tatsache der Lösung, denn wenn die erwähnte Öffnung von dem Barschembryo selbst gerissen worden wäre, hätte es die Hülle offensichtlich sofort auch verlassen.

Der Zusammenhang zwischen der Bildung, des hüllenlösenden Stoffes und der Temperatur wird durch unsere das Schlüpfen beschleunigenden und das Schlüpfen verzögernden Experimente bestätigt. So schlüpft z. B. das bei 27° Celsius zum Reifen gebrachte Zanderei noch bevor das Embryo das völlige Reifestadium erreicht hätte. Das ausgeschlüpfte Embryo ist nicht fähig zu schwimmen, seine Bewegungen sind zappelnd und nicht koordiniert. Es entwickelt sich nur nach 1—2 Tagen — ausserhalb der Eierhülle — zu einem reifen Embryo. Das zum Schlüpfen reife Embryo desselben Fisches kann in einem Wasser von 5—7° Celsius, auch 7—14 Tage lang in der Eierhülle zurückgehalten werden während welcher Zeit das Auge sich völlig pigmentiert und der Dottersack fast zur Hälfte resorbiert wird. Die nach der Zurückhaltung schlüpfende Larve schwimmt wagrecht und verhält sich wie eine recht entwickelte Larve. Auch das Schlüpfen des Karpfeneis kann mit niedriger Temperatur verzögert werden. In einem Wasser dessen Temperatur unter 14° Celsius ist, schlüpft das Welsembryo schon nicht mehr, sondern geht innerhalb kurzer Zeit zugrunde. Die Beschleunigung der Hüllenlösung ist ein Problem, dessen Lösung für die Fischzüchter eine grosse Hilfe bedeuten würde.

Die die Eierhülle verlassenden Individuen werden darum Larven genannt, weil sie weder morphologisch, noch physiologisch den entwickelten Individuen ähnlich sind. Unter den von den Fischlarven der Umwelt gegenüber gestellten Forderungen, sind der Sauerstoffgehalt und die zur Entwicklung nötige Wärmemenge die wichtigsten.

Im Zusammenhang mit der Atmung der verschiedenen Arten von Fischlarven kann festgestellt werden, dass sie durch die Haut den Sauerstoff aufnehmen und das Kohlendioxyd abgeben. Bei ganz jungen Larven können nur die Anfänge der Kiemgefässe festgestellt werden. Die dem Herzen zu fliessende venöse Blutbahn verbreitet sich im allgemeinen im Dottersack, die Blutkörperschen strömen in einem breiten Streifen dem Herzen zu. Wie anzunehmen, dürfte auch der Gasaustausch in erster Reihe hier vor sich gehen. In das Herz der jungen Fischlarven gelangt also Blut mit Sauerstoffgehalt. Sobald die Kiemen die Funktion der Atmung übernehmen, hört diese Verbreitung der venösen Blutbahn allmählich auf.

Während die Larven des Karpfens, der Bleiarten und des Hechtes unbeweglich sind oder sich nur ganz wenig bewegen, schwimmt die Zanderlarve in senkrechter Richtung und legt in ungefähr 6—7 Sekunden einen Weg von 10 cm zurück. Die Welslarve schlägt — solange die Kiemen nicht entwickelt sind — anfänglich langsam, später schnell mit dem Schwanze um sich. Diese Bewegung der Welslarve dient zur Förderung der Atmung.

Zwei Fischarten haben nach unseren bisherigen Erfahrungen äussere Kiemen: der Schlammpeitzger (*Misgurnus fossilis* L.) und der *Proterorhinus marmoratus* PALLAS. Die äusseren Kiemen des letzteren erscheinen am zweiten Tage des Larvenstadiums (Tafel VI. Abb. 8). Das Blutgefäss löst sich vom

Ansatz aller vier Kiembögen ab und nach einem Ablauf von ungefähr 1,5—2 mm wendet sich das Gefäss und erreicht unmittelbar neben dem aufsteigenden Zweig wieder den Kiembogen. So entsteht aus zwei Blutgefässen ein Blutstrang. Mit dem Aufhören des Larvenstadiums entwickeln sich die aus der Kieme kommenden Gefässe zurück. Die äussere Kieme verschwindet spurlos.

Das Erscheinen der äusseren Kiemen an der Larve des Schlammpeitzgers kann mit den ungünstigen Sauerstoffverhältnissen erklärt werden, unter welchen der Fisch lebt. Der *Proterorhinus marmoratus* PALLAS ist eine vor kurzen aus dem Meer eingewanderte Fischart und da der Sauerstoffbedarf im Meerwasser geringer ist, als im Süsswasser (HESSE—DORFLEIN : Tierbau und Tierleben II. Seite 160. 1943), passte sich die Larve auf diese Weise den schwierigen Atmungsverhältnissen des Süsswassers an. Es könnte den Gegenstand weiterer Untersuchungen bilden, festzustellen, in welchem Masse sich die äussere Kieme des *Proterorhinus marmoratus* PALLAS in den Gewässern mit verschiedenem Sauerstoffgehalt entwickelt.

Auf das infolge des Laichens eintretende Absterben der Ukeleie im Balatoner See (*Alburnus alburnus* L.) lenkten LISZMAN [8] und ENTZ [3] die Aufmerksamkeit der Forscher. Die infolge des Laichens umgekommenen Exemplare betten sich oftmals zwischen die abgelegten Eiklumpen (Tafel V, Abb. 1). Die sich von der Laichstelle entfernenden vollkommen geschwächten Tiere werden die leichte Beute der dort angesammelten Raubfische. Darin sieht ENTZ [3] die Erklärung dafür, dass unter den grösseren älteren Ukeleien des Balatoner Sees männliche Tiere nicht zu finden sind.

Im Laufe von Untersuchungen, die anderen Zwecken dienten, stellte es sich heraus, dass die grösseren und älteren Exemplare der Balatoner Brassen überwiegend männlich sind, obwohl die männlichen Exemplare im allgemeinen kleiner sind, als die gleichaltrigen weiblichen Tiere. Dafür kann nur der eine einzige Umstand als Erklärung dienen, dass der grösste Teil der weiblichen Tiere — nach der ersten oder zweiten Laichperiode — aus irgendeiner Ursache zugrunde geht. Der ungewöhnlich starke Wind brachte es mit sich, dass im Jahre 1952 von dem bei Balatonberény befindlichen, «Nagyitató» genannten Laichplatz das Wasser grösstenteils weggedrängt und so der Laichplatz vorübergehend trockengelegt wurde. Nach der Laichen der Brassen — vor Sonnenaufgang — blieben sehr viele Brassen tot am Laichplatz zurück. Nach den im Schlamme zurückgebliebenen Spuren zu urteilen, rutschte das erschöpfte Tier mühsam seitlich im Schlamme und hinterliess eine tiefe Spur. Am Ende der Spur lag, in leicht gekrümmtem Zustand, den Kopf im Schlamm vergraben, der tote Fisch. (Tafel V, Abb. 2, 3, 4.) Die unterwegs verstreuten Eier lagen entlang der Todesspur. Die Herzhöhle der frischen toten Tiere war stets mit gestocktem Blut gefüllt. Unter Einwirkung der während des Laichens entstandenen Aufregung dürften als Folgeerscheinungen das Aufhören der Herztätigkeit und die krampfartige Körperzuckung aufgetreten sein, infolge welcher der

Fisch bei abnormaler Körperhaltung, mit letzter Kraftanstrengung die Spuren in den Schlamm einprägte. 80% der toten Fische waren Weibchen. Da diese Fälle nicht als sporadisch betrachtet werden konnten und weitere Beobachtungen bestätigten, dass dies während der Laichzeit der Bleie eine sehr häufige Erscheinung ist, sind wir zur Annahme berechtigt, dass ein bedeutende Teil der weiblichen Bleie nach der ersten oder zweiten Laichperiode unter oben geschilderten Umständen zugrunde geht.

LITERATUR

1. Adolphi, H. (1906) Über das Verhalten von Wirbeltierspermatozoen in strömenden Flüssigkeiten. *Anat. Anz.*, **28,** 138—149.
2. Carausu, S. (1952) Tratat de Ichtiologie. Bucuresti.
3. Entz, B. (1951) Téli halrajok vizsgálata 1950—1951-ben a tihanyi Kisöbölben. különös tekintettel a küsz ipari felhasználhatóságára. Examination of winter fish shoals in 1950—51, in the Tihany Kisöböl bay, with special regard for the industrial exploitation of the bleak. *Annal. Biol. Tihany*, **20,** 185—210. (Ungarisch, englische Zusammenfassung.)
4. Entz, B., Woynarovich, E. (1947) Neue Wege zur Ausbrütung von Zandereiern. *Schweiz. Fisch. Zeitung*, **55,** 132—133.
5. Entz, B., Woynarovich, E. (1948) Zanderzucht. *Arch. Biol. Hung.*, **18,** 34—51,
6. Gray, J. (1928) The growth of fishes. II. The growth rate of the embryo of *Salmo fario. Brit. J. Exp. Biol.* **6.**
7. Lindroth, A. (1946) Zur Biologie der Befruchtung und Entwicklung beim Hecht. Stockholm.
8. Liszman, H. V. (1933) Zum Studium der Biologie der Fische im Balatoner See. *Magyar Biol. Kut. Munk.* **6,** 86—92.
9. *Суворов, Е. К.* (1949) Основы ихтиологии. Москва.
10. Schlenk, W., Kahmann, H. (1937) Reaktionskinetische Untersuchungen der Forellenspermatozoen. *Z. vergl. Physiol.*, **24.**
11. Woynarovich, E. (1950) A süllő életigényei különböző életszakaszaiban. Exigences vitales de la sandre dans les différentes phases de sa vie. *Agrártud.*, **2,** 96—100. (Ungarische, französische Zusammenfassung.)
12. Woynarovich, E. (1951) A vizenkívüli halikra-keltetés technikája. The technics of the hatching of roe outside the water. *Állattenyésztési Kut. Int. Évkönyve*, **1,** 127—140. (Ungarisch, englische Zusammenfassung.)
13. Woynarovich, E. (1951) A harcsaikra kikelése és a lárva fejlődése. Hatching of the sheat-fish *(Siluris glanis)* rol and development of the larva. *Állattenyésztési Kut. Int. Évkönyve*, **1,** 141—147. (Ungarisch, englische Zusammenfassung.)
14. Woynarovich, E. (1953) Die künstliche Fortpflanzung des Karpfens. *Acta Agronom. Hung.*, **3,** 423—441.
15. Woynarovich, E., Entz, B. (1949—50) Experiments in the artificial incubation of *Lucioperca sandra* Cuv. et Val. eggs. *Ann. Inst. Biol. Perv. Hung.*, **19,** 65—68.
16. Wunder, W. (1931) Brutpflege und Nestbau bei Fischen. *Ergebn. der Biol.*, **7,** 118—192.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ В СВЯЗИ С ИСКУССТВЕННЫМ РАЗМНОЖЕНИЕМ РЫБ

Э. ВОЙНАРОВИЧ

Автор дает сводку своих эмбриологических и биологических наблюдений, сделанных в ходе искусственного размножения промысловых рыб, как например: щука *(Esox lucius* L.), судак *(Lucioperca lucioperca* L.), карп *(Cyprinus carpio* L.), породы лещей *(Abramis)*, сом *(Silurus glanis)* и т. д. В своих изложениях автор распространяется на вопрос клейкости икры, описывает поведение неоплодотворенной икры судака, которая в 24 часа отделяется от своей оболочки. Он излагает противоположное друг другу

действие температуры и содержания кислорода на развитие рыб. Далее автор описывает часто наблюдаемую гибель лещей *(Abramis brama)* во время нереста, занимается также дыханием личинок рыб и дает описание наружных жабер разноцветных бычковых.

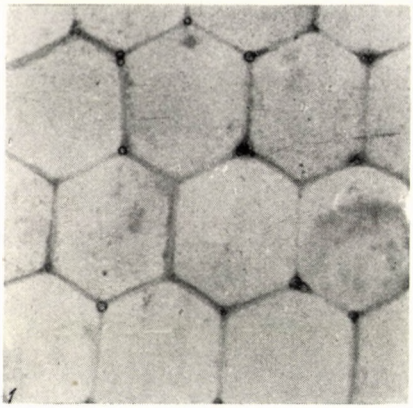
BIOLOGICAL OBSERVATIONS IN CONNECTION WITH THE ARTIFICIAL PROPAGATION OF FISH

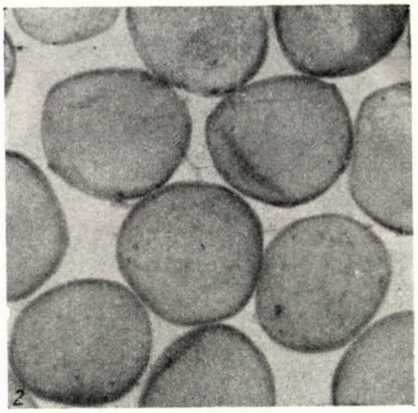
E. WOYNÁROVICH

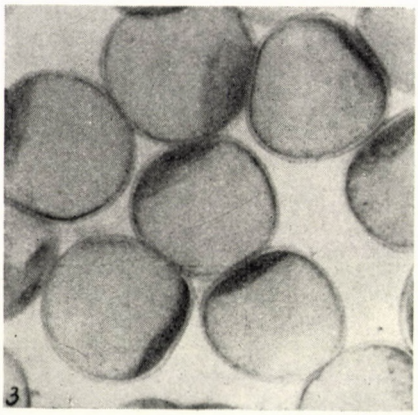
Embryological and biological observations made in the course of artificial propagation of fish, i. e. pike *(Esox lucius* L.*)* pike perch *(Lucioperca lucioperca* L.), carp *(Cyprinus carpio* L.), bream *(Abramis)*, cat-fish *(Siluris glanis)* etc. are described. The author deals with the question concerning the stickiness of roes and describes the behaviour of the non-fertilized pike perch egg which laeves the egg-shell within 24 hours. He expounds on the conflicting effect of temperature and oxygencontent upon development. Furthermore he describes the frequently observed death of breams during Spawning. He deals with the respiration of the diverse fish larvae and publishes the description of the external gill of *Proterrorhinus marmoratus* PALLAS.

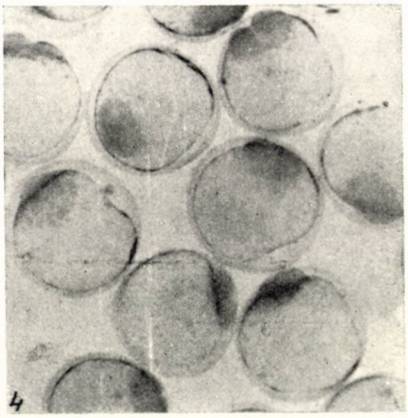
ELEK WOYNÁROWICH, Budapest, II., Herman Ottó u. 15, Ungarn.

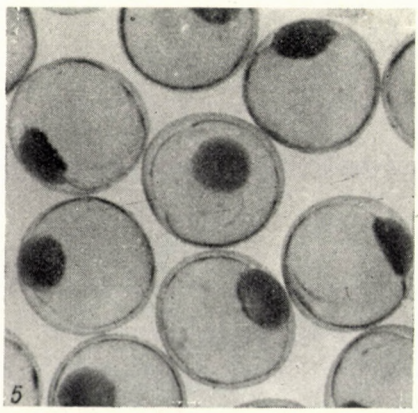
TAFEL I

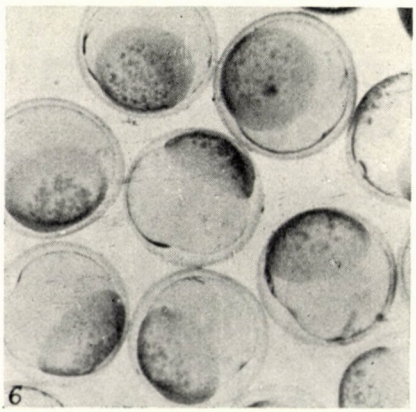

1


2

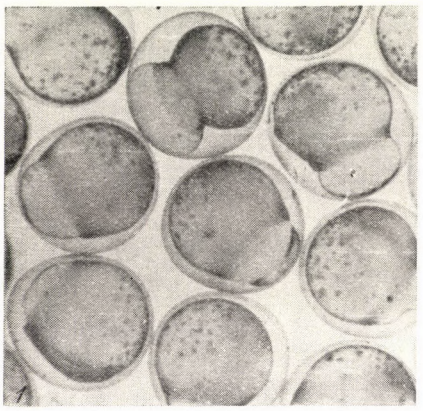

3

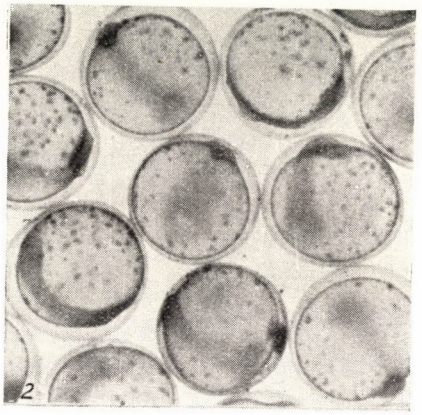

4

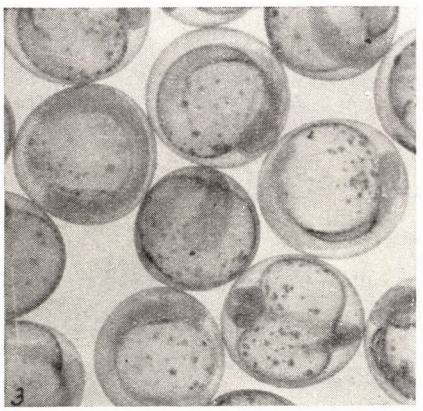

5

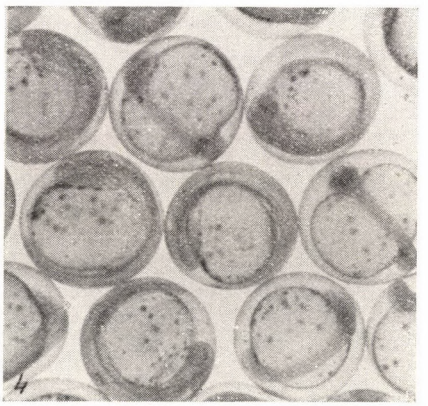

6

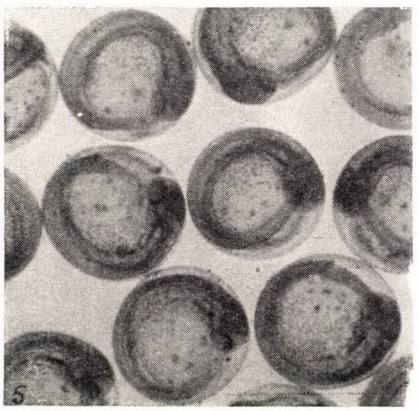
TAFEL II

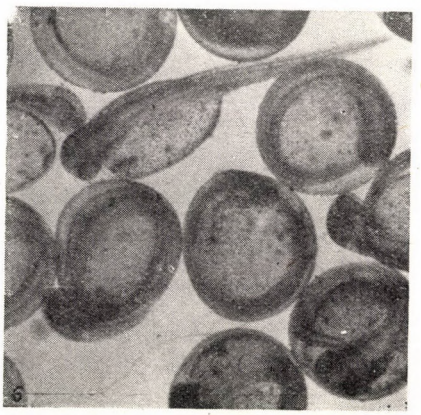




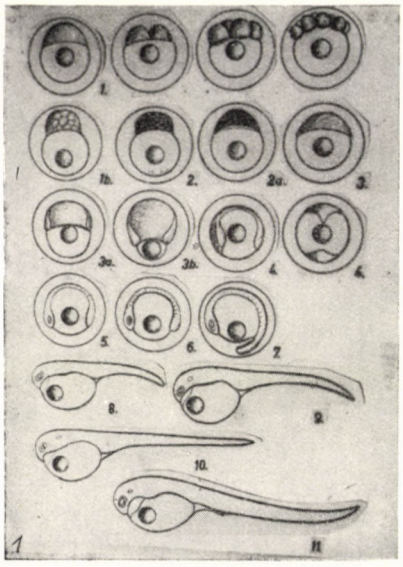


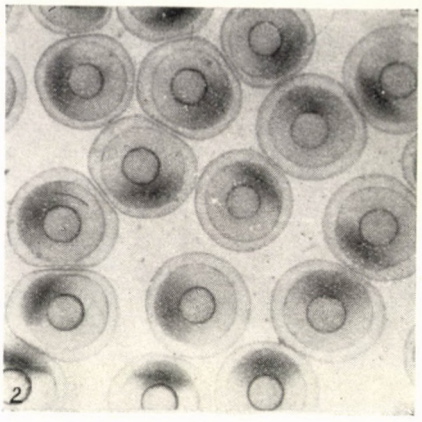


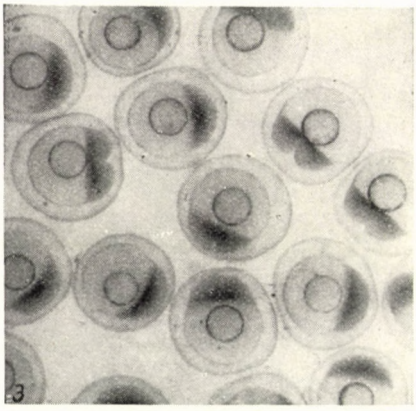


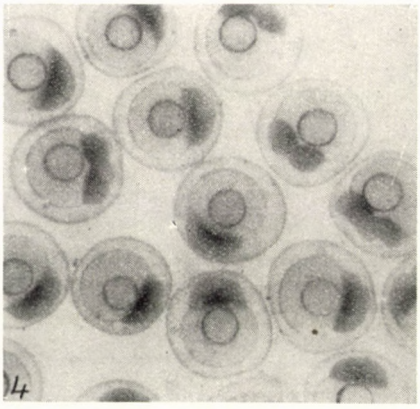


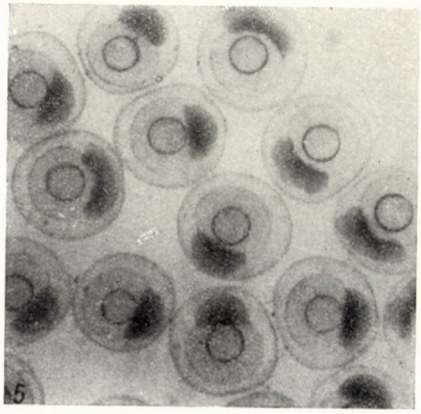
TAFEL III

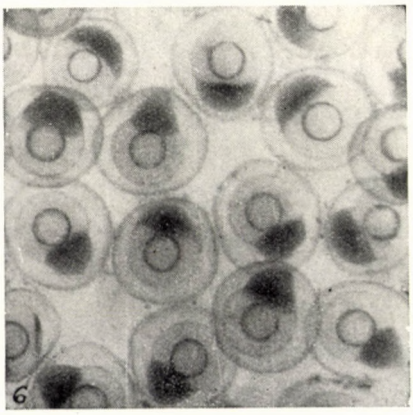




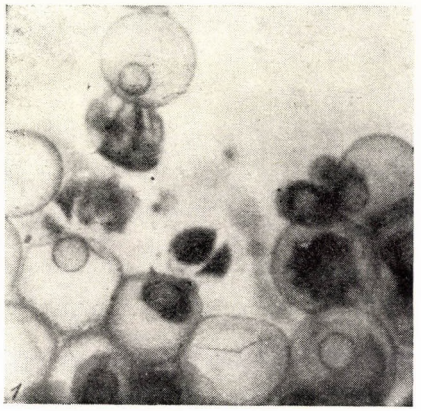


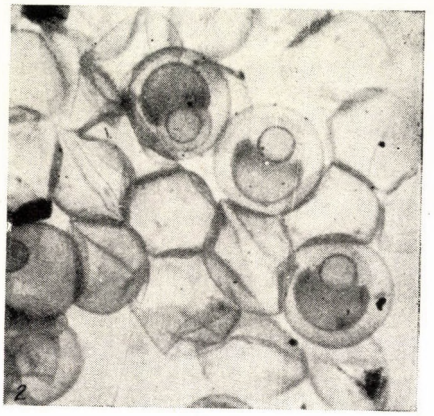


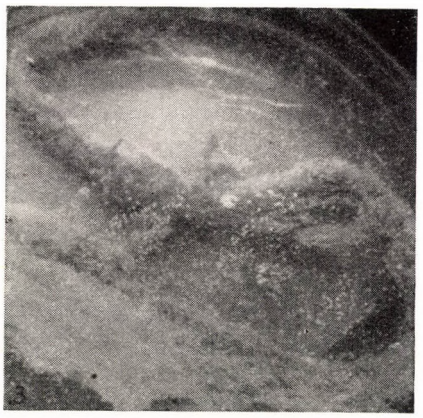


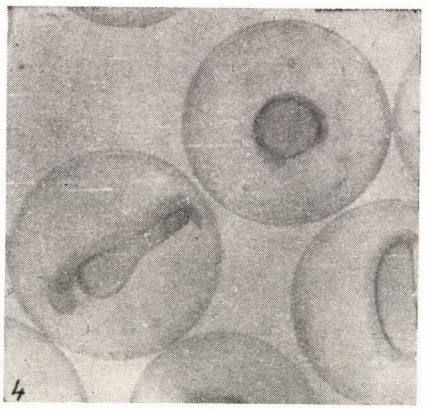


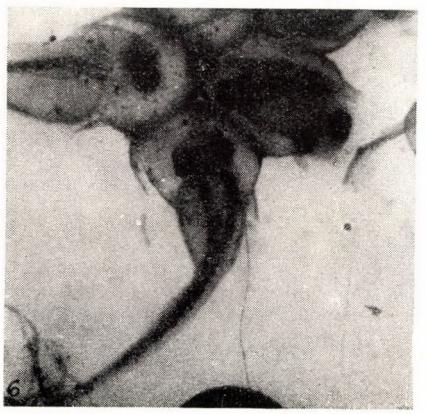
TAFEL IV



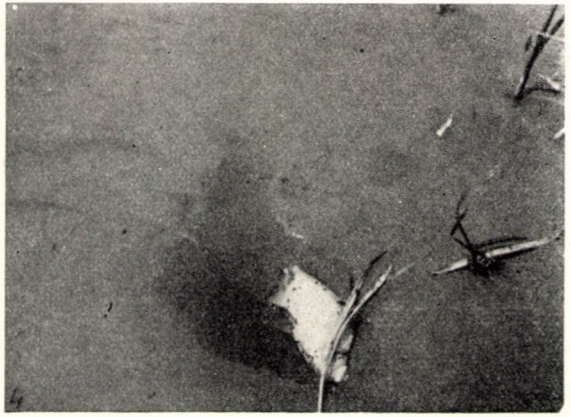




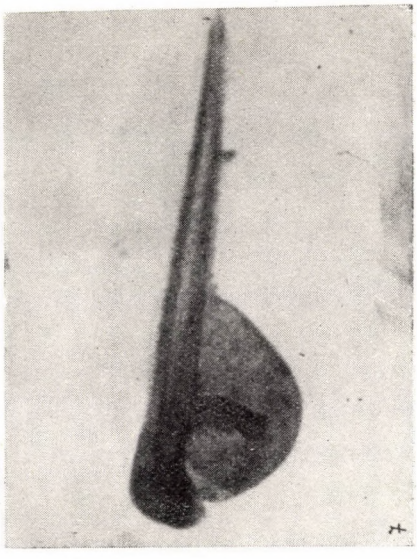




TAFEL V



TAFEL VI



Erklärungen der Abbildungen

Tafel I, Abb. 1—6. Die Entwicklung des Hechteies bei einer Wassertemperatur von 7° Celsius

Abb. 1. Der aus dem Muttertier fliessende, vom Wasser noch nicht berührte plastische Hechtrogen
Abb. 2. Befruchtetes Hechtei, 5 Minuten nachdem es ins Wasser gelangte. Die Eier runden sich ab
Abb. 3. Die Schwellung der Eierhülle und der Beginn der Polarisation
Abb. 4. Nach sechs Stunden beginnt die Teilung des animalen Pols (Zwei-Zellen-Stadium)
Abb. 5. Flachkuppel-Stadium (sich verflachende Morula). Die Nummer des Entwicklungsstadiums ist auf Grund von Tafel III, Abb. 1—2a. Resultat einer 48stündigen Entwicklung
Abb. 6. Kalotten-Stadium (3), das Ei am vierten Tag nach der Befruchtung

Tafel II, Abb. 1—6. Fortsetzung der Tafel I

Abb. 1. Pfropfen-Stadium (3b). Das Ei befindet sich am fünften Tage nach der Befruchtung
Abb. 2. Stadium der Kopfwulstbildung (4), der Blastoporus ist unmittelbar vor der Schliessung
Abb. 3. Beginn der Abschnürung des Schwanzes (7), das Ei am 11. Tage nach der Befruchtung
Abb. 4. Stadium des unreifen Embryos (8), das Ei am 12. Tage nach der Befruchtung
Abb. 5. Stadium des schlüpfbereiten Embryos (11) das Ei am 15. Tage nach der Befruchtung
Abb. 6. Beginn des Schlüpfens des Hechteies

Tafel III

Abb. 1. Die Entwicklungsstadien des Zandereies und des Embryos. Die Nummer neben den Abbildungen weist auf die Nummer des Entwicklungsstadiums. Das zweite 4-Zellen stadium von oben gesehen
Abb. 2. Beginn der Polarisation im Zanderei
Abb. 3. Zwei-Zellen-Stadium, die Eier mit sich nicht teilendem animalen Pol sind nicht befruchtet
Abb. 4. Vier-Zellen-Stadium, bei einer Wassertemperatur von 10° Celsius, nach vierstündiger Entwicklung
Abb. 5. Acht-Zellen-Stadium
Abb. 6. Flachkuppelstadium, der animale Pol der nicht befruchteten Eier spitzt sich zu

Tafel IV

Abb. 1. Der Gehalt der nicht befruchteten Eiern verlässt — in die zweite Eierhülle geschlossen — die Eierhülle (nach Ablauf von 48 Stunden). Zuletzt entfernt sich die Fettkugel (3a, Kalottenstadium)
Abb. 2. Dem Pfropfenstadium vorangehend hat sich der Gehalt der nicht befruchteten Eiern bereits gänzlich entfernt. Neben den in Entwicklung befindlichen Eiern die leeren Eierhüllen
Abb. 3. Der Gehalt des nicht befruchteten Zandereies sammelt sich an der Oberfläche des Wassers
Abb. 4. Halbschwimmendes Ei der Ziege *(Pelecus cultratus* L)
Abb. 5—6. Das Schlüpfen der Karpfenlarve. Die Lösung der Eierhülle ist beendet, nach einigen Minuten verlässt der Schwanz die Eierhülle

Tafel V

Abb. 1. Während des Laichens zugrunde gegangene Ukeleiexemplare *(Alburnus)*, einige sind zwischen den abgelegten Eiklumpen eingebettet
Abb. 2. Während des Laichens zugrunde gegangene Bleie *(Abramis)*, nach dem Laichen wurde der Laichplatz infolge Wassermangels trockengelegt. Die gradlinige Rutschspur ist gut zu erkennen
Abb. 3. Während des Laichens zugrunde gegangene Bleie mit S förmiger Rutschspur im Schlamme
Abb. 4. Während des Laichens zugrunde gegangene Bleie mit muldenförmiger Schlammspur in welcher die während des Todeskampfes herausgelassenen Eier zu sehen sind

Tafel VI

Abb. 5—6. Missbildung einer Hechtlarve mit zwei Köpfen. Von oben und von unten gesehen
Abb. 7. Missbildung einer Hechtlarve mit zwei Köpfen, der zweite Kopfteil besteht nur aus einer kaum differenzierten Zellanhäufung
Abb. 8. Zwei Tage alte Larve mit äusseren Kiemen eines *Proterorhinus marmoratus* PALLAS

PLASMA GLOBULES ARISING FROM SALMONELLA ENTERITIDIS UNDER THE INFLUENCE OF PENICILLIN AND THEIR REVERSION TO THE ORIGINAL BACILLARY FORM

J. VADÁSZ and I. JUHÁSZ

INSTITUTE OF HISTOLOGY AND EMBRYOLOGY (DIRECTOR: I. TÖRŐ) AND INSTITUTE OF MICROBIOLOGY (DIRECTOR: Z. ALFÖLDY) MEDICAL UNIVERSITY, BUDAPEST

(Received: dec. 10, 1954)

Summary

The DANYSZ strain of *Salmonella enteritidis* grown on agar block was exposed to penicillin and the changes brought about were recorded by microcinematography.

On exposure to penicillin individual bacteria increased in volume, intracellular granulation appeared in them. This was followed by disintegration of the bacterial body resulting in the release of liquid cytoplasm. The granule-containing liquid cytoplasm so released (which is likely to be filterable) became then subdivided into minor parts.

The structures that had arisen from bacteria exposed to penicillin were then transferred to penicillin-free agar blocks and the following observations were made: Only some of the drops of plasm regenerate. The morphological pattern of reversion shows unequal fission (»Abschnürung«) fragmentation, and ejection from the globule of plasma. Bacterial regeneration takes place through intermediate non-typical forms. Furthermore, it could be shown that the fragments from the same globule of plasma are not equivalent.

Research on changes in bacterial forms and on the life cycles of bacteria began in the middle of the 19th century (*e. g.* PERTY, 1852) and it has been subject to much controversy ever since whether the plasma particles (spherical forms), 0,2 to 20 microns in diameter, that differ from typical bacterial forms, are to be looked upon as involutive or degenerative forms, or else they are such structures as survived unfavourable conditions and thus ensure survival of the species [1, 6—12, 14, 15, 18, 21, 22, 24, 28, 29, 34, 34/a, 38, 39, 40]. The publication in 1935 of KLIENEBERGER's studies on the L forms, as well as the development of more adequate techniques [2, 6, 16—19, 27, 38] have placed the problem in the focus of interest.

It has been found that the globules of plasma arise under the influence of various effects [6, 9/a, 12, 15, 18, 29, 30, 33, 38]. A swelling-like increase in the volume of the bacterial cell, germination, budding, fusion of bacterial cells or of the granules appearing in them have been suggested to explain the mechanism of their development [18, 23, 32, 33, 35, 36, 38]. On the other hand, reversion to the original bacterial form has been brought into correlation with simple fission, fragmentation, elongation, release of intracellular stunted forms «formes naines» due to rupture of the membrane and their subsequent growth, respectively [9/a, 23, 30, 33, 35, 36, 38].

Of the effects capable of bringing about disintegration of bacteria and formation of globules of plasma, respectively, that of penicillin has been studied

in recent times most extensively [3—6, 9/a, 30, 31, 33, 37]. We, too, have examined the effect of penicillin on Salmonella enteritidis and then studied the reversion to the parent form of structures that had been formed under the influence of that antibiotic.

Methods

To melted 2 per cent meat-peptone-agar were added 10 per cent horse serum and from 30 to 50 IU penicillin G sodium dissolved in physiologic saline. From the solidified thin plate blocks (approximately 20 × 15 mm in size each) were excised and placed on slides. 6 to 10-hour cultures of *Salmonella enteritidis* var. *Danysz* were diluted with physiologic saline so that the drop on the surface of the agar block contain a small number of single bacteria after the cover slip has been put in place. The covered preparation was then sealed with paraffine.

Reversion of the plasma globules arisen under the influence of penicillin to the parent bacterial form was studied by the following method. The penicillin-serum agar prepared as described was plated out into a Petri dish. After it had solidified the diluted bacterial suspension was dropped on the surface of the medium in the Petri dish and the cover slip was put in place. After the penicillin effect developed (in about 5 hours), the cover slip was removed and gently washed with serum broth. Care was taken to avoid, as much as possible, injury to fragile particles attached to the cover slip. The cover slip was then placed onto a penicillin-free agar block containing 10 per cent horse serum. Otherwise the preparation was identical with that described for studies on penicillin effect.

The observations were made by means of a microscope-incubator at 37° C and the process was recorded by microcinematography, using a Zeiss phase-contrast objective Ph 90 HI/1,30 and a × 10 compensation ocular. The interval between single exposures was 20 seconds and thus at the normal rate of projection (20 × 16 = 320) the film spun at a speed 320 times the usual.

Results

Penicillin effect (Table I)

After a lag phase of about 2 hours' duration (during which no further division could be recorded), the individual bacteria become elongated, well-defined granulation appears in the bacterial body (Fig. 1—4), increasing in number along with the increase in size of the bacterial body. The bacteria so growing develop a spindlelike swelling at the middle (Fig. 5 and 6), which bursts after the lapse of some time discharging its content (Fig. 7—14). Later the unburst remainder of the bacterial body also undergoes disintegration and some of the parts separated from the bulk swell and appear similarly as liquid drops (Fig. 8—10). The majority of the plasma-like structures, originating either from the spindle or from other parts of the bacterial body, are then subdividing into minor drops. In this way plasma globules, varying in diameter from 1 to 10 miscrons, are formed, which, after some time become motionless in the penicillin medium. Prior to the subdivision of the escaped plasma — particularly in the phase following the bursting of the spindle — it can be clearly seen that the liquid mass contains granules.

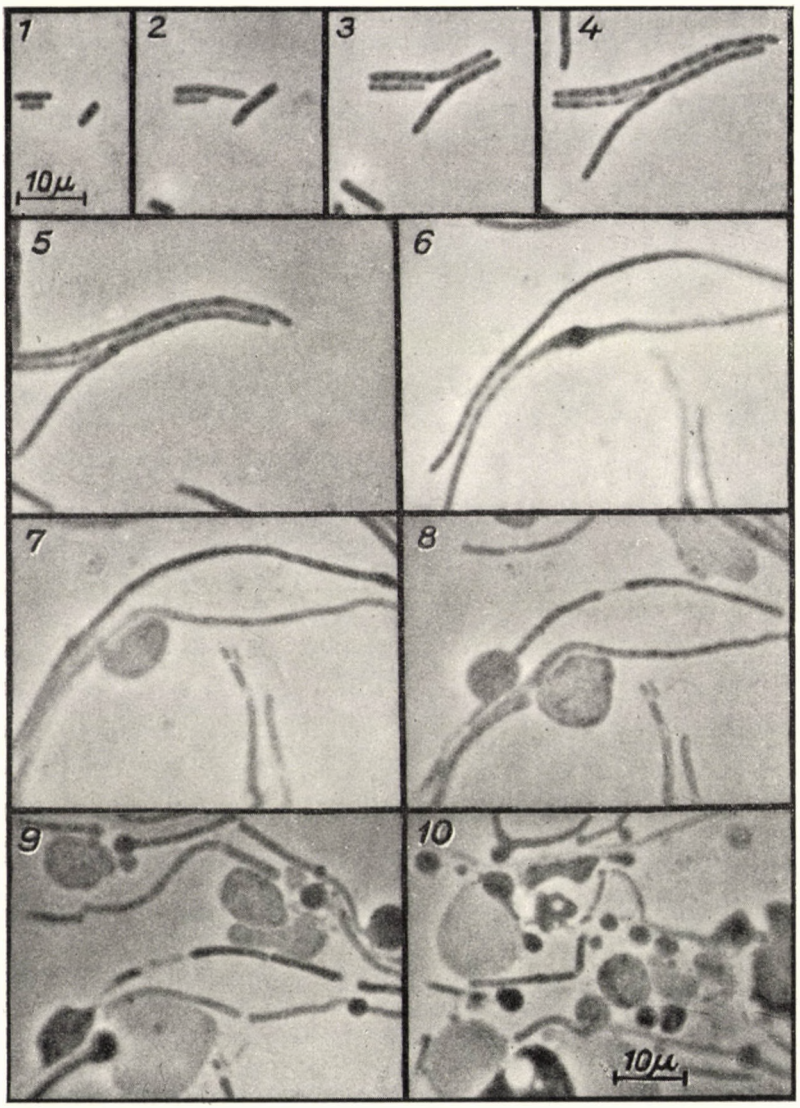


Table I. Development of penicillin effect. (Fig. 1 to 10.) Span of observation : 3 hours

Regeneration (Tables II—VI)

In further studies it was examined how the structures that had developed as described above, reverted to the parent form. It can be seen in the micro-cinematographs that not every drop of plasma regenerates. Neither do the rod-

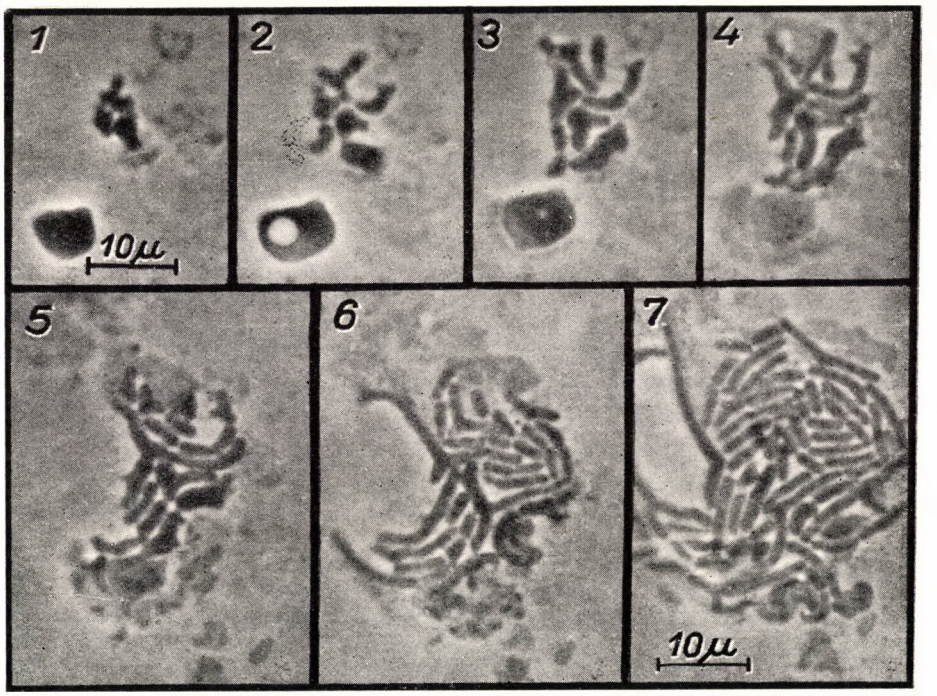


Table II. The fragments arisen from drop of cytoplasm reverting to the parent bacillary forms through intermediate forms. (Figs. 1 to 7.) Span of observation: 2 hours

lets remaining after the bacteria had disintegrated show any regenerative tendency. So far, we could record by cinematography 5 distinct forms of the reversion which begins after a lag phase of about 2 hours duration. Let us deal with these one by one.

II. In this series of pictures the changes of a plasma globule, divided into 3 parts, are shown. The globule is gradually broken up into more and more parts (Figs. 1—5). Meanwhile, the other globule of plasma near to it spreads out rapidly and melts into the heap of fragments that had developed. This makes the impression as if the fragments used up the substance of this separate mass of plasma. Typical bacillary forms appear only later and these divide in the usual way (Figs. 6 and 7).

Table III. Development of bacteria from parts split off from drop of cytoplasm. (Figs. 1 to 10.)
Span of observation : 3 hours

III. This series shows a drop of plasma exhibiting marginal fragmentation (Fig. 1). Evidence derived from the above series, as well as other observations indicate that the minor structures adjacent to the drop of plasma could arise not only by fission at the onset of reversion, but some of them might have devel-

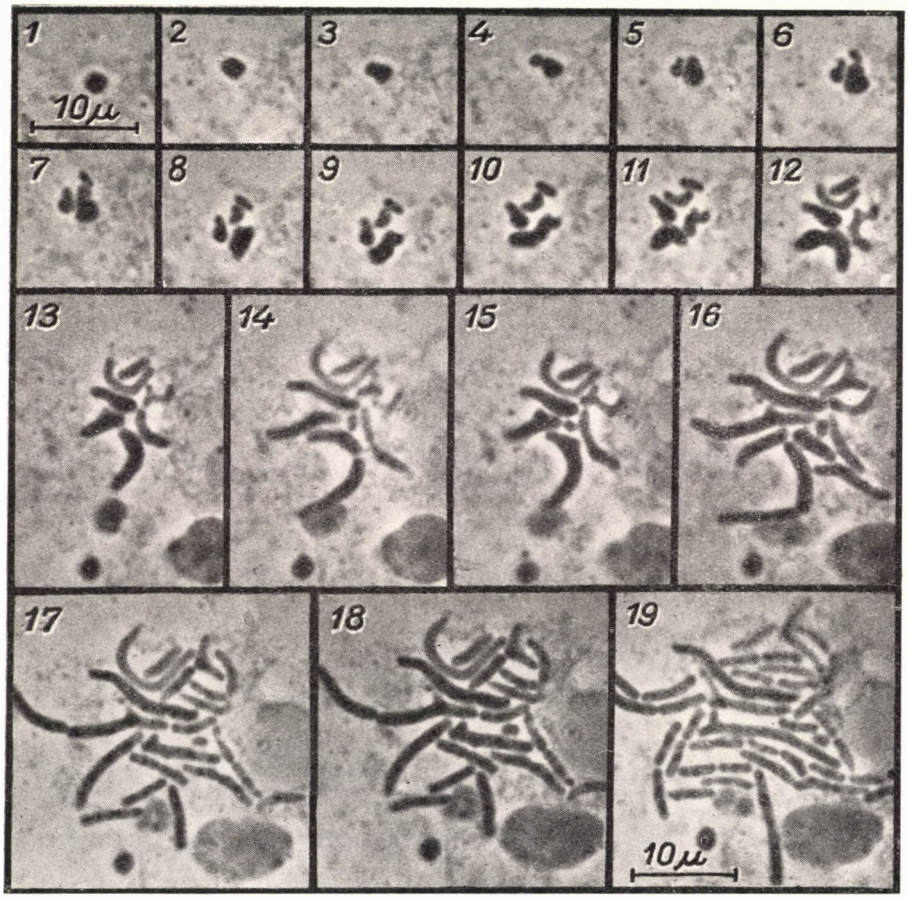


Table IV. Regeneration from plasma globule by disproportionate fission and by «ejection». (Figs. 1 to 19.) Span of observation: 3 hours

oped as separate globules of plasma in the course of exposure to penicillin already. Subsequently these parts of plasma are broken up as described above (Fig. 2—10).

IV. Here the process starts from a plasma globule, 2 microns in diameter (Fig. 1). Multiplication takes place by disproportionate fission (Figs. 3 and 4), not infrequently in conjunction with changes resembling «expulsion» (Figs. 5 and 6) and is continued for long through non-typical forms (Figs. 7—13), until the typical forms shown in Fig. 14 make their appearance.

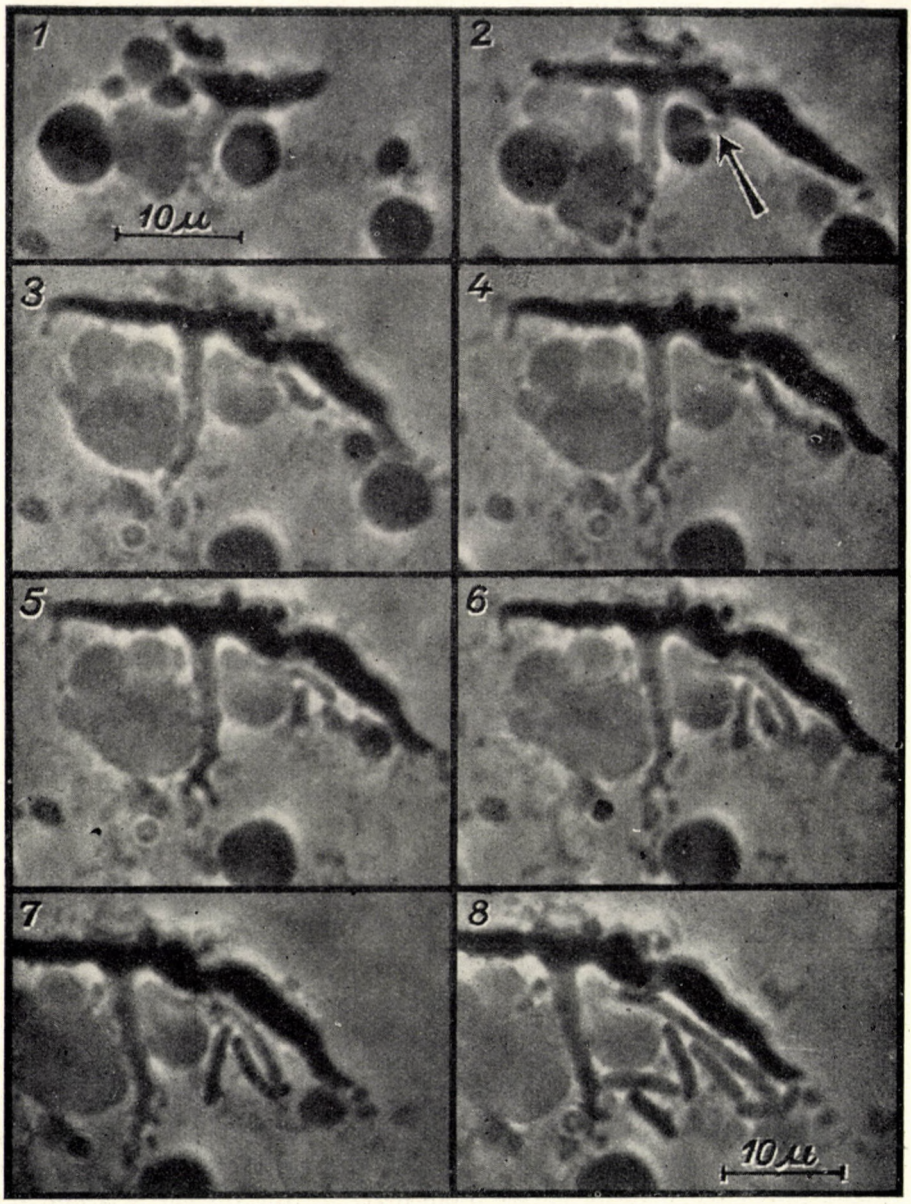


Table V. Development of giant form and appearance of early atypical forms by serial «ejections». (Figs. 1 to 8.) Span of observation: 1 hr. 30 min.

V. In this series it can be clearly seen that some drops increase in size enormously, while others are fused by confluence changing their shape continuously. The arrow points at the first bacterium-like form (Fig. 2), which is followed by the appearance of others in rapid succession (Figs. 4—8.).

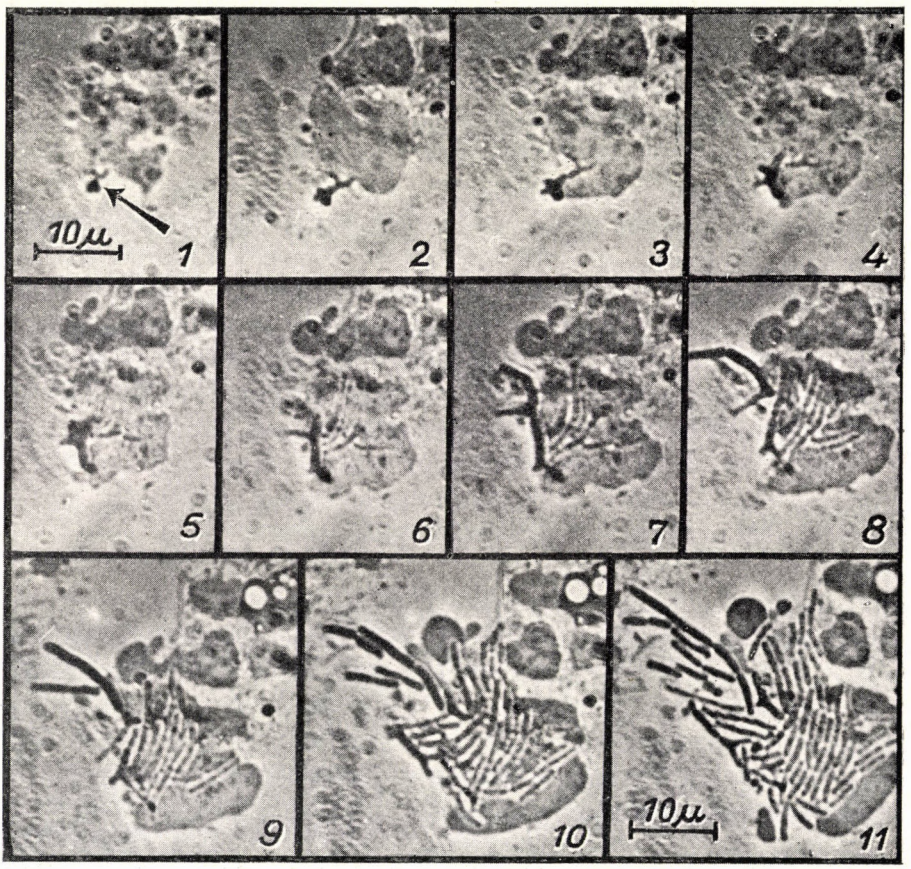


Table VI. Fragmentation of a major spot of cytoplasm following the penetration of a process emitted by another plasma drop. (Figs. 1 to 11.) Span of observation: 3 hours

VI. A plasma particle emitting a fine process with several branches into a major plasma drop near to it can be seen in Fig. 1 to 3. Unfavourable optical conditions prevented us from determining precisely the further fate and fragmentation of this process. The fact that in the course of 1 hour some 40 individual bacteria appear in that area suggests the possibility that the growth of the process into the flattened major drop of plasma would initiate a fragmentation of the latter and thus the process would *quasi* inductively induce reversion to the parent form. It is, of course, also possible that what we deal with here is a

rapid growth and fragmentation of the process itself, induced by the — presumably optimal — conditions it encountered in the flat plasma spot.

Discussion

On the basis of observations made, the following conclusions can be drawn on the process of disintegration :

In bacteria, increased in size due to penicillin, intense granulation appears, which is detectable also in the cytoplasm escaping in the course of disintegration. In our opinion these granules play a highly important role ; it is likely that they serve as the starting point of regeneration [12/*a*, 17/*a*]. One might suggest that these granules are nothing else than spores, but the fact that both the morphology of the reversion process and the special conditions required for regeneration are different from the phenomena exhibited by sporeforming bacteria appears to justify the conclusion that the granules are not equivalent to the spores of sporeforming bacteria.

There is clear-cut cinematographic evidence to show that the cytoplasm escaping from the bacterial body swollen in consequence of penicillin action is liquid and possesses no cell walls. Thus, it is justified to assume that the escaped cytoplasm, which shows motility and can be considered to be living matter, will pass through bacterial filters.

As to the conditions required for the regeneration process, the following can be ascertained: The plasma particle from which the process starts (the plasma globule, the granule) absorbs the substances required for complete reversion from its environment. It is highly probable that such parts of plasma as contain these substances are in the immediate proximity of the plasma globule in the agar block [20/*a*]. On the other hand, filtration will mechanically break up such parts and thus there is only very slight possibility of such parts occurring close to one another. This accounts for the fact that regeneration occurs less frequently and takes much more time in filtrates than in blocks of agar, without filtration. This would explain also the result of one of our earlier experiments in which the fibrin structure employed in a liquid medium may have promoted a collection of such particles, and, through this, regeneration [13].

In spite of strenuous efforts made to reproduce the experiments with not even the slightest alteration in technique, each process of regeneration followed up was found to be different. Obviously, this is due in part to some minor variations in the experimental procedure, which could not be avoided even with the most meticulous care and which could affect the unusually sensitive structures we had been working with. Under experimental conditions the process may be influenced by several factors, and under natural conditions the number of such factors may be expected to be considerably higher. The extreme variability of the morphological pattern both in the loss and in the

repeated recovery of cellular form also points into this direction. We do not wish to imply, of course, that the variability of morphological patterns would mean variability of the fundamental biological process. Still, in numerous regeneration experiments we have gained the impression that there appear to be processes which differ from each other also biologically. Further experiments are required, however, for a full elucidation of this problem.

In recent years numerous authors have illustrated their observations with serial photographs [9/a, 23, 30—33, 36]. Most of these workers studied B. proteus. We have shown for Salmonella enteritidis that in the course of reversion to the parent form unequal fission, fragmentation, development within the plasma drop, oreven «ejection» («expulsion») from the plasma drop occur. Of these, two observations are believed to be of importance. One is the process of «ejection», which appears to suggest that the first individuals develop within the drop of plasma and are then ejected from it in rapid succession (Tables IV and V). The other is the sudden onset of fragmentation within a major spot of plasma due to the penetration into it of a process emitted by another globule of plasma (Table VI). The latter is of particular interest because it involves the appearance of a microcolony, which develops at a rate exceeding by far the normal rate of bacterial multiplication and a part of the colony develops by by-passing intermediate forms.The cinematographic records of these two phenomena are thought to be of interest, because, to our knowledge, similar records have not been published hitherto.

In the initial stage of regeneration intermediate forms entirely different from the bacterial ones (amoeboid, fungonid, protozoid) appear in every case. These increased in number, then reverted to the parent form, some earlier, others later. Nevertheless, large numbers of atypical forms were still in evidence after the lapse of considerable time. This fact may be of particular importance from the point of view of the development of variants.

Finally, a comparison of our results with observations by other authors reveals that the phenomena recorded were similar in many respects to those reported by other workers, although we have studied a different bacterium. From this fact we had to draw the conclusion that what we deal with is a phenomenon, which is to be taken as a law for microorganisms, but which has a general biological significance, too [6, 12, 14, 18, 21, 25, 34, 38]. Apart from the fact that the cellular reorganisation of bacteria offers an explanation for the survival under unfavourable conditions of a strain of microbe and for the arisal of variants, it throws a new light on our views as regarding the phylogenesis of cellular living organisms.

We are gratefully indebted to I. Balázs for his valuable technical assistance.

LITERATURE

1. Almquist, E. (1917) Wuchsformen, Fruktification und Variation der Typhusbakterie. *Z. Hyg.*, **83/84**, 1—18.

2. Dienes, L. (1942) The Significance of the Large Bodies and the Development of L Type Colonies in Bacterial Cultures. *J. Bact.*, **44**, 37—74.

3. Dienes, L. (1947) Isolation of Pleuropneumonia-like Organisms from *H. influenzae* with the Aid of Penicillin. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **64**, 166—168.

4. Dienes, L. (1948) Isolation of L Type Colonies from Typhoid Bacilli with the Aid of Penicillin. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **68**, 589—590.

5. Dienes, L. (1949) The Development of Proteus Cultures in the Presence of Penicillin. *J. Bact.*, **57**, 529—546.

6. Dienes, L., Weinberger, H. (1951) The L Forms of Bacteria. *Bact. Rev.*, **15**, 245—288.

7. Enderlein, G. (1925) Bacterien-Cyclogenie..... Berlin.

8. Hadley, Ph. (1927) Microbic Dissociation . . . *J. Infect. Dis.*, **40**, 1—312.

9. Heilman, F. R. (1941) A Study of *Asterococcus muris (Streptobacillus moniliformis)*. *J. Infect. Dis.*, **69**, 32—44.

9/a. Höpken, W., Bartmann, K. (1955) Phasenkontrastmikroskopische Beobachtung des durch Penicillin ausgelösten L-Cyolus von Bact. protens. *Zbl. Baker. I. Orig.* **162**, 372—385.

10. *Имшенецкий, А. А.* (1940) Строение бактерий. Москва.

11. Juhász, I. (1954) Изменчивость микроорганизмов в свете изучения фильтрующихся форм бактерии. *Acta Physiol. Hung.*, **5**, 261—272.

12. Juhász, I. (1954) A mikroorganizmusok változékonysága különös tekintettel a bakteriumok szűrhető formáira. On the variability of microorganisms with special reference to the filtrable forms of bacteria. *Biol. Közl.*, **2**, 51—67. (In Hungarian, with English summary.)

12/a. Juhász, I., Lovas, B., Egyessy, D. M. (1955) Electron Micrographic Examination of Bacteriogenesis from Filtrable Forms *(Salmonella enteritidis* var. Danysz) *Acta Physiol. Hung.* **8**, 97—108.

13. Juhász, I., Vadász, J. (1955) Regeneration of the Filtrable Forms of *Salmonella enteritidis* in Media Containing Blood Plasma (Fibrin Structure). (In Press).

14. *Калина, Г. П.* (1949) Изменчивость патогенных микроорганизмов. Киев.

15. *Калина, Г. П.* (1954) Развитие микробных клеток из доклеточного вещества. Киев.

16. Klieneberger, Emmy (1934) The Colonial Development of the Organisms of Pleuropneumonia and Agalactia on Serum Agar and Variations of Morphology under Different Conditions of Growth. *J. Path. Bact.*, **39**, 409—420.

17. Klieneberger, Emmy (1935) The Natural Occurrence of Pleuropneumonia-like Organisms in Apparent Symbiosis with *Streptobacillus moniliformis* and Other Bacteria. *J. Path. Bact.*, **40**, 93—105.

17/a. Klieneberger, Emmy, Smiles, J. (1942) Cit. after Liebermeister [20].

18. Klieneberger-Nobel, Emmy (1951) Filterable Forms of Bacteria. *Bact. Rev.*, **15**, 77—103.

19. Klieneberger-Nobel, Emmy (1954) Microorganisms of the Pleuropneumonia Group. *Biol. Rev.*, **29**, 154—184.

20. Liebermeister, K. (1953) Untersuchungen zur Morphologie der Pleuropneumonia (PPLO) Gruppe. *Z. Naturforsch.*, **8** b, 757—766.

20/a. Liebermeister, K. (1953) Untersuchungen über Bakterien L-Formen *Zbl. Bakter. I. Orig.*, **160**, 250—259.

21. Löhnis, F. (1922) Studies Upon the Life Cycles of the Bacteria . . . *Mem. Nat. Acad. Sci. Washington*, **16**, 1—252.

22. Löhnis, F. (1922) Zur Morphologie und Biologie der Bakterien. *Zbl. Bakter. II. Orig.*, **56**, 529—544.

23. Medill, M. A., Hutchinson, W. G. (1954) The Reversion of the L Form of Proteus mirabilis into the Rod Form. *J. Bact.*, **68**, 89—92.

24. Mellon, R. R. (1925) Studies in Microbic Heredity. I. Observations on a Primitive Form of Sexuality (Zygospore Formation) in the Colon-Typhoid Group. *J. Bact.*, **10**, 481—501.

25. Mellon, R. R. (1926) Studies in Microbic Heredity. V. The Biogenetic Law of Haeckel and the Origin of Heterogeneity within Pure Lines of Bacteria. *J. Bact.*, **11**, 203—252.

27. Orskov, J. (1922) Method for the Isolation of Bacteria in Pure Culture from Single Cells and Procedure for the Direct Tracing of Bacterial Growth on a Solid Medium. *J. Bact.* **7**, 537—549.

28. Orskov, J. (1947) Some Observations on Aberrant Bacteria Morphology. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **24,** 198—202.

29. *Пешков, М. А.* (1954) О так называемых L-формах бактерии (Обзор). *Микробиология*, **23,** 607 – 628.

30. von Prittwitz und Gaffron, Jutta (1953) Zum Gestaltwandel der Bakterien. *Naturwiss.*, **40,** 590—594.

31. Pulvertaft, R. J. V. (1953) The L Forms of Bacteria in Relation to Antibiotics. *J. Path. Bact.*, **65,** 175—184.

32. Schächter, M. (1952) Formation of Large Bodies in a Member of the Genus Bacillus, *Science*, **116,** 637—638.

33. Schellenberg, Hildegard (1954) Untersuchungen über die durch Penicillin induzierte Pleomorphie bei *Proteus vulgaris*. *Zbl. Bakter. I. Orig.*, **161,** 434—457.

34. Sinkovics, J. (1954) Az élet sejtelőtti formái a mikrobiológiában. Precellular Forms of Life in the Microbiology. *Biol. Közl*, **2,** 69—81. (Review in Hungarian, with English summary.)

34/a. Sinkovics, J. (1955) Untersuchungen über die Wechselwirkung nichtantibiotischer Pilze und Bakterien. *Acta Microbiol. Hung.* **2,** 257—264.

35. Stähelin, H. (1954) Über osmotische Verhalten und Fusion nackter Protoplasten von *Bac. anthracis*. *Schweiz. Ztschr. allg. Path.*, **17,** 296—310.

36. Stempen, H., Hutchinson, W. G. (1951) The Formation and Development of Large Bodies in *Proteus vulgaris*. I. *J. Bact.*, **61,** 321—344.

37. Tulasne, R. (1949) Sur une évolution possible des Proteus vers des microcolonies des formes inframicroscopiques sous l'effet de la pénicilline. *C. rend. Soc. Biol.*, **143,** 289—291.

38. Tulasne, R. (1954) Le cycle L et les formes naines des bactéries. Symposium on Bacterial Cytology, VI. Intern. Congr. Microbiol. Roma (1953). 144—181.

39. Wahlin, J. G., Almaden, Ph. J. (1939) Megalomorphic Phase of Bacteria. *J. Infect. Dis.*, **65,** 147—155.

40. *Жолкевич, А. Я.* (1952) Проблема овразования реактивных форм у бактерий в свете учения О. Б. Лепешинской. *Усп. совр. биолог.*, 33, 101 – 116.

ОБРАЗОВАНИЕ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ШАРИКОВ ИЗ SALMONELLA ENTERITIDIS ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПЕНИЦИЛЛИНА И ИХ РЕГЕНЕРАЦИЯ В КЛЕТОЧНУЮ ФОРМУ

Я. ВАДАС, И. ЮХАС

Процессы наблюдались на штаммах Salmonella enteritidis var. Danysz. при помощи методики агарового блока и прослеживались микрокинематографическими съемками.

Под действием пенициллина бактерии набухают, в них проявляется зернистость, затем происходит дезинтеграция, и их протоплазма вытекает в виде жидкой массы. Эта вытекшая, содержащая зернышки плазма, — которая, по всей вероятности, фильтруема, — распадает на мелкие части.

При размещении этих образований, полученных из бактерий, подвергнутых действию пенициллина, на свободном от пенициллина агаровом блоке, авторы сделали следующее наблюдение: регенерация происходит лишь у одной части плазматических капель. Морфологическая картина регенерации показывает отшнуровывание, фрагментарность, выбрасывание из плазматических капель. Регенерация бактерий временная, она происходит путем атипичных форм, а можно установить и то, что фрагменты из одного и того же плазматического шарика неравноценны.

DIE BILDUNG VON PLASMAKUGELN AUS SALMONELLA ENTERITIDIS AUF WIRKUNG VON PENICILLIN UND DEREN RÜCKBILDUNG IN BAZILLÄRE FORM

J. Vadász, I. Juhász

Die Prozesse wurden mit Hilfe der Agarblockmethode an dem *Salmonella enteridis* var. *Danysz*-Stamm beobachtet und an mikrokinematographischen Aufnahmen verfolgt.

Die Bakterien schwellen auf Einwirkung des Penicillins an, es erscheint in ihren Granulation, sie zerfallen und ihr Protoplasma strömt in Form einer flüssigen Masse aus. Dieses Körnchen enthaltende ausgeronnene Plasma — das wahrscheinlich filtrierbar ist — löst sich in kleinere Teile auf.

Werden die der Penicillinwirkung ausgesetzten, aus Bakterien entstandenen Gebilde auf einen penicillinfreien Agarblock gesetzt, so lässt sich beobachten, dass sich bloss ein Teil der Plasmakugeln regeneriert. Das morphologische Bild der Rückbildung zeigt Abschnürung, Fragmentation und eine aus dem Plasmatropfen erfolgende Ausstossung. Die Regeneration der Bakterien vollzieht sich über atypische Übergangsformen, wobei auch festgestellt werden kann, dass die aus ein und derselben Plasmakugel stammenden Fragmente nicht gleichwertig sind.

János Vadász, Budapest, IX. Tűzoltó u. 58, Hungary
István Juhász, Budapest, IX. Hőgyes Endre u. 7., Hungary

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója Műszaki felelős: Farkas Sándor
Kézirat beérkezett: 1955. V. 13. — Terjedelem: 16 (A/5) ív, 71 ábra

Akadémiai Nyomda, Gerlóczy u. 2. — 36542/55 — Felelős vezető: ifj. Puskás Ferenc

Les *Acta Biologica* paraissent en russe, français, anglais et allemand et publient des travaux du domaine des sciences biologiques.

Les *Acta Biologica* sont publiés sous forme de fascicules qui seront réunis en un volume.

On est prié d'envoyer les manuscrits destinés à la rédaction et écrits à la machine à l'adresse suivante :

Acta Biologica, Budapest, IX., Tűzoltó u. 58.

Toute correspondance doit être envoyée à cette même adresse.

Le prix de l'abonnement annuel est de 110,— forints par volume.

On peut s'abonner à l'Entreprise du Commerce Extérieur de Livres et Journaux «Kultúra» (Budapest, VI., Sztálin út 21., compte courant No : 43-790-057-181) ou à l'étranger chez tous les représentants ou dépositaires.

The *Acta Biologica* publish papers on biological subjects in Russian, French, English and German.

The *Acta Biologica* appear in parts of various size, making up one volume.

Manuscripts should be typed and addressed to:

Acta Biologica, Budapest, IX., Tűzoltó u. 58.

Correspondence with the editors and publishers should be sent to the same address.

The rate of subscription to the *Acta Biologica*, is 110 forint a volume. Orders may be placed with «*Kultúra*» Foreign Trade Company for Books and Newspapers (Budapest, VI., Sztálin út 21. Account No : 43-790-057-181) or with representatives abroad.

Die *Acta Biologica* veröffentlichen Abhandlungen aus dem Bereiche der biologischen Wissenschaften in russischer, französischer, englischer und deutscher Sprache.

Die *Acta Biologica* erscheinen in Heften wechselnden Umfanges. Mehrere Hefte bilden einen Band.

Die zur Veröffentlichung bestimmten Manuskripte sind, mit Maschine geschrieben, an folgende Adresse zu senden :

Acta Biologica, Budapest, IX., Tűzoltó u. 58.

An die gleiche Anschrift ist auch jede Korrespondenz für die Redaktion und den Verlag zu senden.

Abonnementspreis pro Band beträgt 110 Forint. Bestellbar bei dem Buch- und Zeitungs-Aussenhandels-Unternehmen «*Kultúra*» (Budapest, VI., Sztálin út 21. Bankkonto Nr. : 43-790-057-181) oder bei seinen Auslandsvertretungen und Kommissionären.

46,— Ft

INDEX

KRÁMLI, A.—LANTOS, J.—STUR, J.: Die Wirkung von Redoxsystemen auf den Stoffwechsel von Mikroorganismen. I. Die Wirkung des C-Hämins auf die Atmung der Hefe. — Действие окислительно-восстановительных систем на обмен веществ микроорганизмов. I. Действие С-гемина на дыхание дрожжей — The action of redox-systems on the metabolism of microorganisms. I. The action of C-hemin on the respiration of yeast 1

GIMESI, N. I.: Kolloidchemie der Hämateinate und ihre Rolle in der Mikrotechnik. — Коллоидная химия гематеинатов и их роль в микротехнике — The colloidal chemistry of hemateinates and their role in microtechnics 7

KARDOS, J.—KIS BAGOLY, R.: Studies on the extracellular developmental possibilities of mitochondria in the cells of plants. — Исследования возможностей внеклеточного развития митохондрий растительных клеток — Untersuchungen über die extrazelluläre Entwicklungsmöglichkeiten der Mitochondrien der pflanzlichen Zelle 19

ÁBRAHÁM, A.: Microscopic innervation of the cornea with reference to the neural connections of the fibrocytes. — Микроскопическая иннервация роговицы с особым учетом нервных связей фиброцитов — Die mikroskopische Innervation der Hornhaut mit Rücksicht auf die Nervenverbindungen der Fibrozyten 31

GELLÉRT, J.: Die Ciliaten des sich unter der Flechte *Parmelia saxatilis* MASS. gebildeten Humus. — Инфузории гумуса, образовавшегося под лишайником *Parmelia saxatilis* MASS. — The ciliates of the humus under the lichen *Parmelia saxatilis* MASS. 77

GIMESI, N. I.—POZSÁR, B. J.: About the physiology of protoplasmic movements. — О физиологии движения цитоплазмы — Über die Physiologie der Zytoplasmabewegung 113

BALÁZSY, L.: Experimentelle Beeinflussung der Gewebequalität des Amputationsstumpfes. — Экспериментальное воздействие на качество ткани ампутационной культи — Experiments influencing the quality of the tissue of the amputation stump 133

WOYNÁROVICH, E.: Biologische Beobachtungen im Zusammenhange mit der künstlichen Züchtung von Fischen. — Биологические наблюдения в связи с искусственным размножением рыб — Biological observations in connection with the artificial propagation of fish 149

VADÁSZ, J.—JUHÁSZ, I.: Plasma globules arising from *Salmonella enteritidis* under the influence of penicillin and their reversion to the original bacillary form. — Образование плазматических шариков из *Salmonella enteritidis* под действием пенициллина и их регенерация в бацилларную форму — Die Bildung von Plasmakugeln aus *Salmonella enteritidis* auf Wirkung von Penicillin und deren Rückbildung in bazilläre Form 171

ACTA BIOLOGICA

ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS
A. ÁBRAHÁM, B. FALUDI, B. GYŐRFFY, L. HARANGHY, I. SZÖRÉNYI,
J. SZENTÁGOTHAI, I. TÖRŐ

REDIGIT
R. MAUCHA

TOMUS VI FASCICULI 3—4

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
BUDAPEST, 1956

ACTA BIOL. HUNG.

ACTA BIOLOGICA

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA BIOLÓGIAI KÖZLEMÉNYEI

SZERKESZTŐSÉG: BUDAPEST, IX., TŰZOLTÓ-U. 58. KIADÓHIVATAL: BUDAPEST, V., ALKOTMÁNY U. 21.

Az *Acta Biologica* orosz, francia, angol és német nyelven közöl értekezéseket a biológiai tudományok köréből.

Az *Acta Biologica* változó terjedelmű füzetekben jelenik meg, több füzet alkot egy kötetet.

A közlésre szánt kéziratok, géppel írva, a következő címre küldendők:

Acta Biologica szerkesztősége: Budapest, IX., Tűzoltó u. 58.

Ugyanerre a címre küldendő minden szerkesztőségi és kiadóhivatali levelezés.

Az *Acta Biologica* előfizetési ára kötetenként belföldre 80 forint, külföldre 110 forint. Megrendelhető a belföld számára az *Akadémiai Kiadó*-nál (Budapest, V., Alkotmány utca 21. Bankszámla 05-915-111-44), az Akadémia Könyvesboltban (Budapest, Váci utca 22.), a külföld számára pedig a »*Kultúra*« Könyv és Hírlap Külkereskedelmi Vállalatnál (Budapest, VI., Sztálin út 21. Bankszámla: 43-790-057-181), vagy külföldi képviseleteinél és bizományosainál.

«*Acta Biologica*» публикуют трактаты из области биологии на русском, французском, английском и немецком языках.

«*Acta Biologica*» выходят отдельными выпусками разного объема. Несколько выпусков составляют один том.

Предназначенные для публикации рукописи (в напечатанном на машинке виде) следует направлять по адресу:

Acta Biologica, Budapest, IX., Tűzoltó u. 58.

По этому же адресу направлять всякую корреспонденцию для редакции и администрации.

Подписная цена «*Acta Biologica*» — 110 форинтов за том. Заказы принимает Предприятие по внешней торговле книг и газет «*Kultúra*» (Budapest, VI., Sztálin út 21. Текущий счет № 43-790-057-181) или его заграничные представительства и уполномоченные.

DIE WIRKUNG VON REDOXSYSTEMEN AUF DEN STOFFWECHSEL VON MIKROORGANISMEN

II. REDOXPOTENTIAL-UNTERSUCHUNGEN AM HEFE-C-HÄMIN-KOMPLEX

A. KRÁMLI, JUDIT LANTOS und JUDIT STUR

CHEMISCHES UND BIOCHEMISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, SZEGED
(VORSTAND: A. KRÁMLI)

(Eingegangen am 15. Februar 1955.)

Zusammenfassung

Unsere Hemmungsversuche lassen vermuten, dass der von uns als Modell benutzte Hefe-C-Häminkomplex das C-Hämin irgendeines der Oxydationsfermente des Trikarbonsäurezyklus ersetzt. Die Hefe entfernt das ihr körperfremde Hämin durch Aufhebung der Bindung infolge spontaner Enzymadaptation und stellt das anfangs veränderte Redoxpotential wieder her. Das Cytochrom C bringt in der Hefekultur eine anhaltende Erhöhung des Redoxpotentials zustande. Bei Anwesenheit des ihr körpereigenen Stoffes entfaltet die Zelle keine Redoxpufferwirkung.

Nach den in unserer vorhergehenden Mitteilung [2] bekanntgegebenen Untersuchungen wird die endogene Respiration der Hefe von den Eisen-Porphyrinsystemen, namentlich dem C-Hämin [1] gesteigert und gleichzeitig damit das Redoxpotential der Kultur stark herabgesetzt. Diese Herabsetzung läuft parallel mit der Steigerung der Respiration: das Redoxpotential erreicht sein Minimum zur Zeit der maximalen Respiration, und mit dem Nachlassen der Atmung nähert es sich wieder seinem Ausgangswerte. Diese Feststellungen liessen aber auch ferner die Frage offen, welcher Art einerseits das durch das an die Hefe gebundene C-Hämin zustande gebrachte Oxydationssystem ist und anderseits, wie das Enzymsystem der Zelle auf die veränderten Redoxverhältnisse reagiert.

Zur Entscheidung dieser Frage wurden Untersuchungen in folgenden Richtungen angestellt:

1. Auf welche Weise kann die Respiration des Hefe-Häminkomplexes beeinflusst werden? Inwiefern kann sie mit Inhibitoren gehemmt, bzw. die Hemmung mit C-Hämin aufgehoben werden?

2. Welche Beziehungen bestehen zwischen dem Redoxpotential der Kultur und dem Hefe-Häminkomplex?

3. Kann mit Hilfe von Redoxmessungen erwiesen werden, dass das C-Hämin tatsächlich nicht mit dem Hämin des Cytochrom C identisch ist?

Die erste Frage suchten wir mit den Ergebnissen unserer Hemmungsversuche zu beantworten. Diese Hemmungsversuche geben Auskunft darüber, wie sich der Hefe-Häminkomplex zu den Oxydationsfermenten (Respirationsferment, Cytochrom C) verhält.

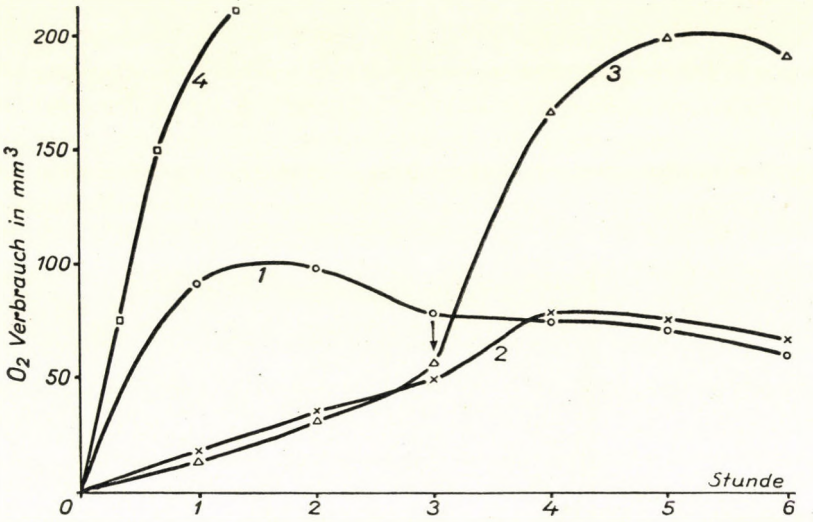


Abb. 1. Änderung der Atmung des C-Häminkomplexes der Hefe auf die Wirkung von KCN. 1. Endogene Atmung der Hefe. 2. Atmung der mit 10^{-3} Mol KCN gehemmten Hefe. 3. Atmung nach Hemmung mit 10^{-3} Mol KCN + 75 γ Hämin. 4. Atmung des C-Häminkomplexes der Hefe. (Hefekonzentration: 6,6 mg Hefe-Trockensusbtanz/3 ml Kultur; KCN-Konzentration: 10^{-3} Mol; Sauerstoff-Verbrauch: mm^3/3 ml Kultur)

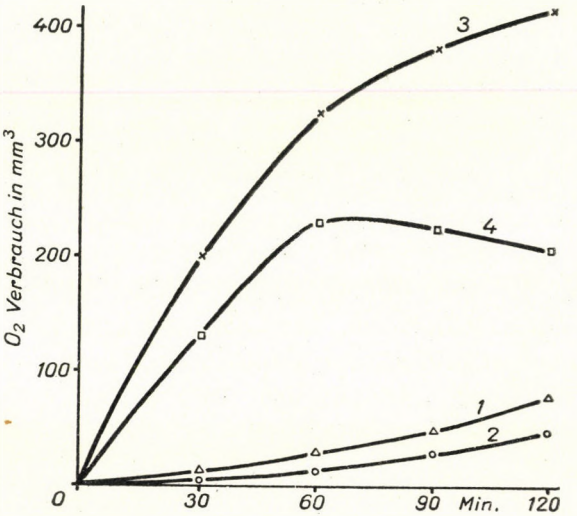


Abb. 2. Änderung der Atmung des C-Häminkomplexes der Hefe auf die Wirkung von Monojodessigsäure. 1. Endogene Atmung der Hefe. 2. Atmung der mit 10^{-3} Mol Monojodessigsäure gehemmten Hefe. 3. Atmung des Häminkomplexes der Hefe. 4. Atmung nach Hemmung mit 10^{-3} Mol Monojodessigsäure + 75 γ Hämin. (Hefekonzentration: 6,6 mg Hefetrockensubstanz/3 ml Kultur; Monojodessigsäurekonzentration: 10^{-3} Mol; Sauerstoff-Verbrauch: mm^3 /3 ml Kultur)

Zur Klärung dieser Frage wurde die Atmung mit Kaliumcyanid gehemmt. Wenn nämlich die Hemmung, welche die Funktion des Respirationsfermentes lähmt, mit C-Hämin aufgehoben werden kann, so muss die Bindung vom Typ des Respirationsfermentes sein. In diesen Versuchen wurde zunächst diejenige minimale KCN-Menge ermittelt, die gerade noch eine Hemmung der Funktion des Respirationsfermentes bewirkte. Durch Zugabe von C-Hämin zu einer solchen gehemmten Hefe wurde der Sauerstoffverbrauch der Kultur nicht ge-

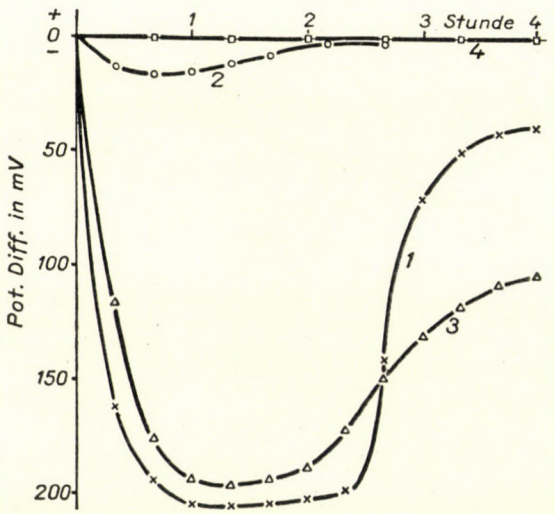


Abb. 3. Redoxpotential-Veränderung des C-Häminkomplexes der Hefe auf die Wirkung von KCN und Monojodessigsäure. 1. Änderung des Redoxpotentials der Hefe auf die Wirkung von C-Hämin. 2. RP-Veränderung der mit 10^{-3} Mol KCN gehemmten Hefe auf die Wirkung von C-Hämin. 3. RP-Veränderung der mit 10^{-3} Mol Monojodessigsäure gehemmten Hefe auf die Wirkung von C-Hämin. 4. RP-Veränderung des Hefefiltrats auf die Wirkung von C-Hämin. (Der Trockensubstanzgehalt der benutzten Hefe-Kultur und die hinzugefügte C-Häminmenge entsprechen den in Abb. 1 und 2 angegebenen Verhältnissen)

steigert und übertraf den Wert der endogenen Respiration erst nach Verlauf von drei Stunden, wenn die hemmende Wirkung des KCN schon abgeklungen war (Abb. 1). Übereinstimmende Ergebnisse zeitigten auch unsere Redoxuntersuchungen, denen zufolge nach Zugabe von Hämin zu der mit KCN gehemmten Hefe die charakteristische Redoxherabsetzung nicht in Erscheinung tritt (Abb. 3, Kurve 2). Hieraus ergibt sich, dass die vom C-Hämin mit irgendeinem der Hefeproteine gebildete Verbindung die Rolle des Respirationsfermentes nicht zu erfüllen vermag.

Unsere Versuche mit Monojodessigsäure (MJE) zeigten aber, dass die Hemmung mit C-Hämin aufgehoben werden kann und sogar — im Verhältnis zur endogenen Respiration — eine hochgradige Steigerung zu beobachten ist (Abb. 2). Die Redoxkurve des mit MJE behandelten Hefe-Hämins stimmt mit der des MJE-freien Hefe-Hämins nahezu überein (Abb. 3, Kurve 3).

Die Atmung der Hefe kann aber mit Hämin nur vorübergehend gesteigert werden: parallel mit dem Rückgange der Atmung auf ihren Ausgangswert steigt der Redoxwert an. Zur Erklärung dieser Erscheinung haben wir während der Versuchsdauer den in der Kultur von der Hefe gebundenen Hämingehalt und die zu den verschiedenen Häminmengen gehörigen Redoxpotentialwerte bestimmt und gefunden, dass die Erhöhung des Redoxpotentials immer eine Begleiterscheinung der Häminabspaltung ist. Demnach

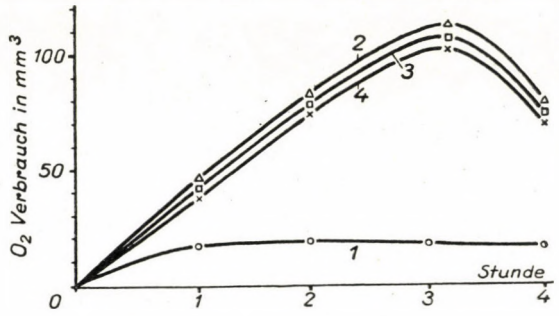


Abb. 4. Änderung der Hefeatmung auf die Wirkung des schon einmal an die Hefezellen gebundenen, aber wieder freigewordenen C-Hämins. Das vom Hefe-C-Hämin Komplex abdissoziierte C-Hämin — neuen Kulturen beigefügt — bewirkt eine Atmungsteigerung der Kulturen. 1. endogene Atmung der Hefe. 2. Atmung des C-Hämin-Komplexes der Hefe (75 γ Hämin/3 ml Kultur). 3. Hefe + 1 m/des von der Hefe abdissoziierten C-Hämins nach 1 Stunde. 4. Hefe + 1 m/des von der Hefe abdissoziierten C-Hämins nach 3 Stunden. (Hefekonzentration: 6,6 mg Trockensubstanz/3 ml Kultur)

verhält sich die Hefezelle dem ihr fremden Porphyrinsystem gegenüber quasi als Redoxpuffer. Das abgespaltene Hämin beeinflusst Atmung und Redoxwerte einer neuen Kultur ähnlich wie die der vorhergehenden, was bedeutet, dass infolge der Pufferwirkung das C-Hämin strukturell unverändert geblieben ist (Abb. 4).

Die auf die Wirkung des C-Hämins zustandegekommene Redoxpufferwirkung der Hefe ist aber von beschränkter Dauer. Werden nämlich der Hefe steigende Mengen C-Hämins zugegeben, so tritt die Herabsetzung der Redoxwerte bzw. die Steigerung der Respiration auf den Originalwert erst später in Erscheinung (Abb. 5).

Wird der Hefe Cytochrom C hinzugefügt, so erfährt die Atmung — im Gegensatz zu C-Hämingebrauch — keine wesentliche Veränderung. Beträchtlich erhöht wird dagegen das Redoxpotential der Kultur: der Unterschied des Redoxpotentials zwischen C-Hämin-Hefe und Cytochrom-C-Hefe beträgt rund 400 mV (Abb. 6).

Es wurde auch die Reinigung des C-Hämins nach der chromatographischen Methode von SCHALES [3] versucht, jedoch konnte so zwischen dem C-Hämin des Cytochrom C und dem C-Hämin nicht unterschieden werden. Die Verände-

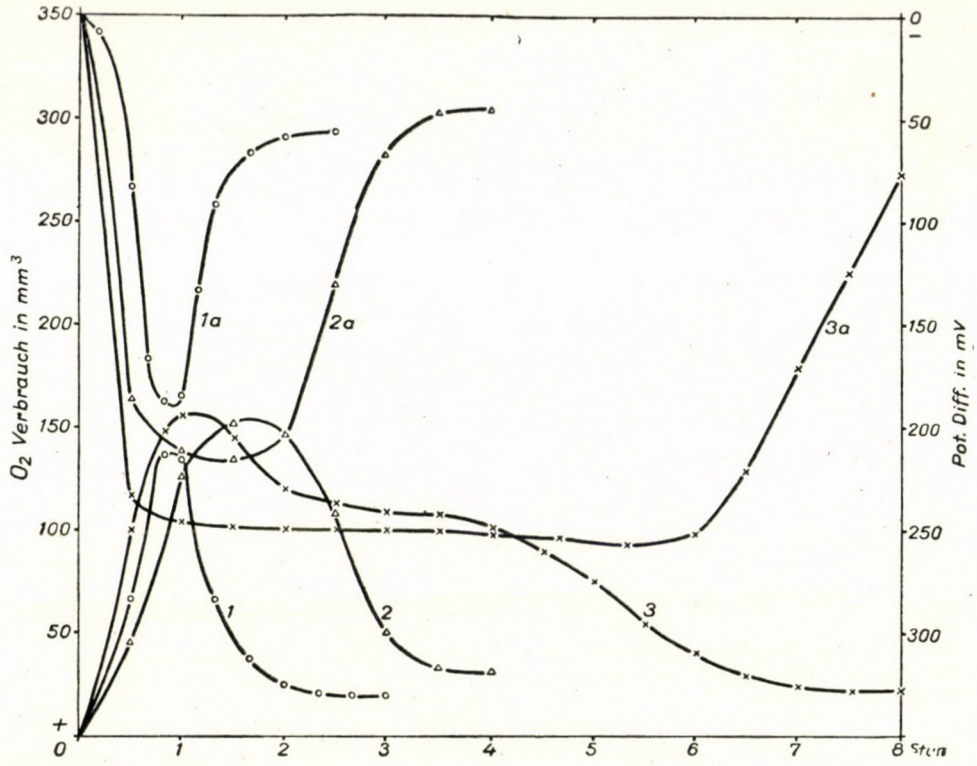


Abb. 5. Änderung der Atmung und des Redoxpotentials der Hefe nach Zugabe verschiedener Mengen C-Hämine. 1, 2 und 3. Atmungskurven; 1a, 2a und 3a die entsprechenden RP-Kurven der Hefe. 1. Änderung der Atmung nach 25 γ C-Hämin/3 ml Kultur der Hefe. 1a. Änderung des RP nach 25 γ C-Hämin/3 ml Kultur der Hefe. 2. Änderung der Atmung nach 100 γ C-Hämin/ 3 ml Kultur der Hefe. 2a. Änderung des RP nach 100 γ C-Hämin/3 ml Kultur der Hefe. 3. Änderung der Atmung nach 200 γ C-Hämin/3 ml Kultur der Hefe. 3a. Änderung des RP nach 200 γ C-Hämin/3 ml Kultur der Hefe. (Hefekonzentration: 6,6 mg Trockensubstanz/3 ml Kultur)

rung des Redoxwertes beweist aber eindeutig, dass es sich hier um zwei verschiedene Stoffe handelt. Das Redoxpotential des Cytochrom C-Hefesystems bleibt — im Gegensatz zu dem des Hefe-Hämins — längere Zeit hindurch konstant (Abb. 6, Kurve 2), was beweist, dass die Zelle dem ihr körpereigenen Porphyrinsystem gegenüber keine Redoxpufferwirkung entfaltet.

Methodik und Versuchsergebnisse

Die Respirationsversuche wurden am WARBURG-Manometer und die Redoxmessungen mittels glatter Platinelektrode am Metrohm-Titriskop vorgenommen. Zunächst wurden die von der Budapester Spiritus- und Hefe-Fabrik bezogene Bäckerhefe III. Generation und später einen Tag alte Saccharomyces-

Cerevisiae-Schüttelkulturen untersucht. Nach dem Zentrifugieren und Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung wurde die entsprechende Konzentration am Nephelometer eingestellt.

Das C-Hämin wurde nach dem Verfahren von BARKAN und SCHALES hergestellt und seine Konzentration mit der in unserer vorhergehenden Mitteilung beschriebenen FORSTER—SNELL'schen Eisenbestimmungsmethode ermittelt. Als Inhibitoren gelangten 0,001 Mol Monojodessigsäure und 0,001 Mol KCN zur Anwendung. Die Hefekonzentration in den einzelnen Versuchen betrug 6,6 mg Trockensubstanz/3 ml Kultur.

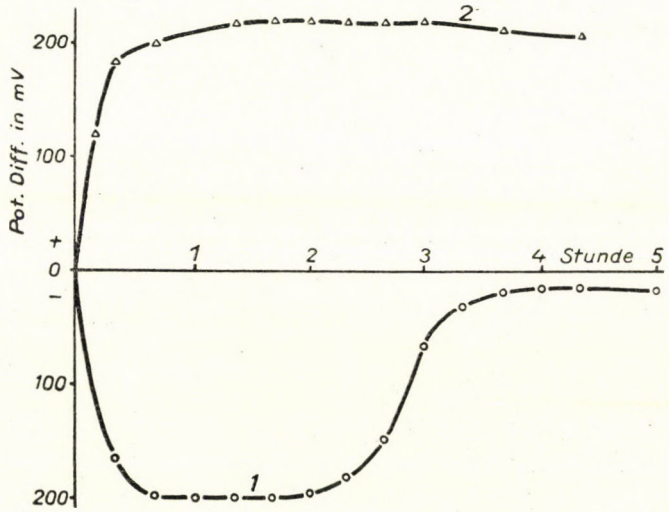


Abb. 6. Änderung des Redoxpotentials der Hefe auf die Wirkung von C-Hämin und Cytochrom C. 1. Änderung des Rp der Hefe auf die Wirkung von 100 γ C-Hämin. 2. Änderung des Rp der Hefe auf die Wirkung von 100 γ Cytochrom C. (Hefekonzentration : 6,6 mg Trockensubstanz/3 ml Kultur)

Kontrollen: Zum Beweise dessen, dass das Hämin die Redoxpotentialveränderungen tatsächlich an der Hefezelle selbst bewirkt, haben wir in physiologischer Kochsalzlösung suspendierte Hefe abzentrifugiert und das Hämin zu der zellfreien Hefelösung gegeben. Nun wurde keine Veränderung beobachtet.

LITERATUR

1. BARKAN, G., SCHALES, O. (1937) Ein wasserlösliches C-Hämin aus Blut. *Z. physiol. Chem.*, **246**, 181—193.

2. KRÁMLI, A., LANTOS, J., STUR, J. (1955) Die Wirkung von Redoxsystemen auf den Stoffwechsel von Mikroorganismen. I. Die Wirkung des C-Hämins auf die Atmung der Hefe. *Acta Biol. Hung.*, **6**, 1—6.

3. SCHALES, O. (1937) Ein wasserlösliches C-Hämin aus Blut. II. Die chromatographische Anreicherung des C-Hämins und sein Verhalten bei der Enteisenung. *Ber.*, **70**, 1874—1880.

ДЕЙСТВИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ СИСТЕМ НА ОБМЕН ВЕЩЕСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ

II. Исследования окислительно-восстановительного потенциала в комплексе дрожжей-С-гемина

На основании результатов своих опытов по торможению авторы предполагают, что применяемый ими в качестве модели комплекс дрожжей-С-гемина замещает С-гемин какого-нибудь окислительного фермента из цикла трикарбоновой кислоты.

Дрожжи удаляют инородный им гемин путем вызванного спонтанной энзиматической адаптацией прекращения связи и восстанавливают измененный вначале окислительно-восстановительный потенциал.

Цитохром С вызывает в культуре дрожжей длительное повышение окислительно-восстановительного потенциала. В присутствии этого инородного вещества клетка не оказывает буферного действия в отношении окислительно-восстановительной системы.

THE ACTION OF REDOX-SYSTEMS ON THE METABOLISM OF MICROORGANISMS

II. Oxydation-reduction potential investigations on the yeast-C-haemine-complex

Our inhibition experiments suggest that the yeast-C-haemine-complex, used as a model by us, replaces the C-haemine of some of the oxydation ferments of the tricarbonic acid cycle.

The yeast removes the alien haemine through abolition of the bond owing to spontaneous enzymatic adaptation and restores the initially changed oxydation-reduction potential.

Cytochrome C brings about a prolonged increase in the oxydation-reduction potential in the yeast cultures. In the presence of its own metabolic substance the cell does not develop an oxydation-reduction buffer effect.

ANDRÁS KRÁMLI, Szeged, Tömörkény u. 2/c. Ungarn.

JUDIT LANTOS, Szeged, Somogyi u. 6. Ungarn.

JUDIT STUR, Szeged, Bokor u. 7. Ungarn.

DIE WIRKUNG VON REDOXSYSTEMEN AUF DEN STOFFWECHSEL VON MIKROORGANISMEN

III. EINWIRKUNG DER THIOGLYKOLSÄURE AUF DIE ERGOSTERIN-PRODUKTION IN HEFEKULTUREN

A. KRÁMLI und JUDIT LANTOS

CHEMISCHES UND BIOCHEMISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, SZEGED
(VORSTAND: A. KRÁMLI)

(Eingegangen am 17. Februar 1955.)

Zusammenfassung

In Hefekulturen wurde die Wirkung der Thioglykolsäure auf die Ergosterinproduktion und das Redoxpotential untersucht und gefunden, dass die Thioglykolsäure — als ein das RP der Kulturen stark herabsetzendes Agens — den Ergosterinertrag annähernd verdoppelt. Die Klarstellung des biochemischen Mechanismus des Prozesses ist im Gange.

Einleitung

Mit der Frage des Lipoid- und Sterinstoffwechsels der Hefe hat sich als Erster HALDEN [3] beschäftigt und Zusammenhänge hauptsächlich zwischen Kulturverhältnissen und Ergosteringehalt festgestellt. Nach den Untersuchungen NEUBERG's [7] ist der Ergosteringehalt der Hefe von der Oxydationstätigkeit der Zellen abhängig. Diese Beobachtung haben TAUSEN und ZORKÓCZY [8, 9] mit der praktischen Feststellung ergänzt, dass die aus anaeroben Hefen extrahierbare Ergosterinmenge durch nachträgliche Lüftung gesteigert werden kann.

MAUIGAN und WALKER [6] prüften die Wirkung verschiedener in den Nährboden eingeführter Substrate und stellten dabei fest, dass Na-acetat eine geringere und Ascorbinsäure eine bedeutende Steigerung der Ergosterinproduktion bewirkt. Hydrolysiertes Hefe-Glykogen erwies sich als unwirksam, während Aminosäurengemische oder Thyrosin einen Hemmungseffekt entfalteten. BENETT [2] erreichte eine Erhöhung des Ergosteringehaltes mit nicht toxischen oxydierenden Agentien (Persulfat, Peracetat, Peroxyd, Methylenblau, Indigokarmin), welche er in stark gelüfteten Kulturen mit assimilierbaren Stickstoff nicht enthaltendem Nährboden zur Anwendung brachte.

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass das nach der Methode von BARKAN und SCHALES [1] hergestellte C-Hämin die Atmung der Hefe steigert und, da der Ergosteringehalt von der Oxydationsaktivität der Zellen abhängig ist, war zu erwarten, dass infolge der Wirkung dieses Häminpräparates eine Steigerung des Ergosteringehaltes resultieren müsse. In den Versuchen von HUTTERER [4] hatte sich in gelüfteten Hefekulturen auf den C-Hämineffekt nach 6-stündiger Inkubation der ursprüngliche Ergosteringehalt verdoppelt.

Nach eigenen Untersuchungen wird durch C-Hämin das Redoxpotential (RP) von Hefekulturen herabgesetzt, indem das C-Hämin an die Zelle gebunden wird. Diese Bindung ist jedoch nur eine vorübergehende, nach einer gewissen Zeit wird das Hämin wieder freigesetzt und das ursprüngliche RP der Kultur wieder hergestellt [5]. Demnach ist die in den Zellen stattfindende Sterinsynthese ein an ein niedriges RP der Kultur gebundener Prozess und es liegt die Vermutung nahe, dass durch Eintragen von RP-herabsetzenden Agentien die Sterinsynthese beschleunigt werden müsste. Da die C-Hämindarstellung eine ziemlich langwierige und kostspielige Prozedur und überdies seine Bindung an die Zellen, d. h. seine RP-herabsetzende Wirkung nur eine vorübergehende ist, suchten wir nach möglichst einfachen Stoffen, die das RP der Hefe anhaltend herabzusetzen vermögen.

Die ersten Versuche wurden mit Diphenyl-disulfid-dikarbonsäure vorgenommen, die aber in der Kultur nur eine vorübergehende RP-Herabsetzung bewirkte. Bessere Aussichten schien die Thioglykolsäure zu bieten, die den weiter unten zu schildernden Versuchen nach das RP der Kultur lange Zeit auf niedrigem Niveau hält und die Ergosterinproduktion steigert.

Methoden

Der benutzte obergärige *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm wurde in folgendem Nährboden gezüchtet.

Glukose	10,0	g
Pepton	1,0	g
KH_2PO_4	2,0	g
NaCl	1,0	g
KNO_3	0,8	g
$MgSO_4$	0,25	g
$(NH_4)_2\ SO_4$	1,0	g
$CaCl_2$	0,15	g
dest. Wasser	1000	g
pH 4,5		

Von diesem Nährboden wurden je 200 ml in Erlenmeyerkolben von 1 Liter Inhalt gegeben und die Kolben mit Papierwattestopfen, welche auch die Elektroden und den Apparat zur Probenentnahme enthielten, verschlossen. Sterilisieren 30 Minuten bei 108° C und Beimpfen mit 1 Tag alten, auf Malz-Agar gezüchteten Saccharomyces cerevisiae-Kulturen. Während der 5-tägigen Inkubation wurden die Kulturen an einem magnetischen Pendelschüttelapparat geschüttelt (c = 180/sec ; Ampl. = 48 mm) und das RP täglich am »Metrohm«-Titriskop mit einer glatten Platinelektrode — gegenüber einer Kalomelelektrode — bestimmt.

Die Thioglykolsäure wurde steril in die Kulturen eingetragen und einen Tag darauf die Trockensubstanz der Hefe und der Ergosteringehalt bestimmt.

Ergosterinbestimmung. 50 ml der entnommenen Probe wurden mit einer Lösung von 2,5 g KOH in 50 ml Äthylalkohol versetzt und das Gemisch 4—5 Std. am Wasserbad in einem mit Rückflusskühler versehenen Kolben erhitzt und dann das Hydrolysat dreimal mit je 50 ml Benzol oder Äther extrahiert. Der Extrakt wurde nach mehrmaligem Waschen mit NaOH, verdünnter Salzsäure und dest. Wasser mit geglühtem Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Eindampfen der trockenen Lösung im Vakuum wurde der Rückstand in 3 ml Kohlenstofftetrachlorid gelöst.

Aus der Lösung wurde die Ergosterinmenge auf Grund der LIEBERMANN—BUCHARD'schen Farbreaktion im PULFRICH-Photometer bestimmt. Nach Zugabe von 2 ml Essigsäureanhydrid und 1 ml konz. Schwefelsäure wurde geschüttelt und die Intensität der auftretenden grünen Farbe mit Filter »S 66« festgestellt. Als Standard für die Kalibrationskurve diente eine Lösung aus 0,3 mg Ergosterin/ml CCl_4.

Ergebnisse

Die auf die obige Weise hergestellten Hefekulturen wurden mit wechselnden Mengen Thioglykolsäure versetzt und die dadurch bedingten RP-Veränderungen bzw. die entstandene Ergosterinmenge bestimmt. Die Zugabe der Thioglykolsäure erfolgte gewöhnlich am 5. Tage, wenn das RP in allen Kulturen annähernd gleiche Werte erreicht hatte.

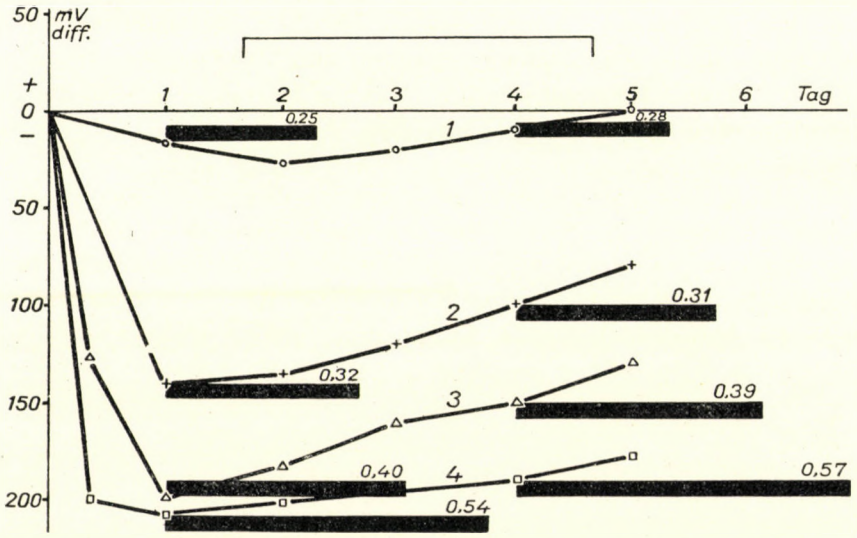


Abb. 1. Veränderung des Redoxpotentials einer Hefekultur auf die Einwirkung von Thioglykolsäure 1. Kontrollkultur. 2. RP-Veränderung nach 0,05 mg Thioglykolsäure/ml Kultur. 3. RP-Veränderung nach 0,5 mg Thioglykolsäure/ml Kultur. 4. RP-Veränderung nach 1,0 mg Thioglykolsäure/ml Kultur. Die fetten Linien bedeuten den Ergosteringehalt, auf Hefetrockensubstanz bezogen, am 1. bzw. 4. Tage nach der Behandlung mit Thioglykolsäure

Zur Zeit der Beimpfung können nämlich bei den einzelnen Kulturen noch sehr abweichende RP-Werte registriert werden, was damit zu erklären ist, dass der Nährboden selbst auch über ein gewisses RP verfügt, welches weitgehend von der adsorbierten Sauerstoffmenge abhängig ist. Durch die zur Vermehrung gelangenden Zellen wird aber allmählich die Redoxkapazität des Nährbodens erschöpft und am 5. Tage stellen sich bei allen Kulturen annähernd gleiche Redoxwerte ein.

Thioglykolsäure bewirkt eine Herabsetzung des Redoxpotentials um etwa 200 mV und dieses niedrige Niveau kann bereits mit minimalen Dosen (50 Gamma/ml Kultur) tagelang gesichert werden.

Abbildung 1 zeigt die auf verschiedene Thioglykolsäuremengen zustandegekommenen RP-Kurven und die Tabelle 1 die Ergosterinproduktion am 1. und 4. Tage nach der Thioglykolsäurezugabe. Die nach 4 Tagen entnommenen Proben zeigen den gleichen Ergosteringehalt wie die am ersten Tage untersuchten, was bedeutet, dass die Produktion ihr Maximum bereits am ersten Tage erreicht hatte.

Tabelle 1

Veränderung des Ergosteringehaltes in Hefekulturen auf die Wirkung verschiedener Thioglykolsäuremengen

Nr.	Thioglykolsäure mg/100 ml Kultur	Hefetrockensubstanz g/100 ml Kultur	Ergosteringehalt in mg/100 ml Kultur		Ergosterin in % auf Hefe-Trockensubstanz berechnet
			am 1. Tage	am 4. Tage	
1	0	0,32	0,8	0,9	0,28
2	5	0,31	1,0	0,96	0,33
3	50	0,34	1,36	1,35	0,40
4	100	0,295	1,6	1,68	0,53

LITERATUR

1. BARKAN, G., SCHALES, O. (1937) Ein wasserlösliches C-Hämin aus Blut. *Z. physiol. Chem.*, **246**, 181—193.

2. BENNETT, W. G. (1942) Yeast and like microorganism having a high ergosterol content. U. S. Patent **2**, 276, 710.

3. HALDEN, W. (1934) Zur Kenntnis des Fett- und Lipoidstoffwechsels der Hefen. III. Sterin- und Fettanreicherung in untergäriger Brauereihefe. *Z. physiol. Chem.*, **225**, 249—272.

4. HUTTERER, F. (1953) Unveröffentlichte Resultate.

5. KRÁMLI, A., LANTOS, J., STUR, J. (1955) Die Wirkung von Redoxsystemen auf den Stoffwechsel von Mikroorganismen. I. Die Wirkung des C-Hämins auf die Atmung der Hefe. *Acta Biol. Hung.*, **6**, 1—6.

6. MAGUIGAN, W. H., WALKER, E. (1940) Sterol metabolism of microorganisms. *Biochem. J.*, **34**, 804—813.

7. NEUBERG, C. (1946) The biochemistry of yeast. *Ann. Rev. Biochem.*, **15**, 435—474.

8. TAUSON, T. A. (1942) Distribution and conditions for accumulation of ergosterol in yeast organisms. *Microbiologiya* (*S. S. S. R.*), **11**, 46—58.

9. ZORKÓCZY, GY. (1943) Increasing the ergosterol content of yeast. *Chem. Abstr.*, **37**, 5190.

ДЕЙСТВИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ СИСТЕМ НА ОБМЕН ВЕЩЕСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ

III. Влияние тиогликолевой кислоты на продукцию эргостерина в культурах дрожжей

Авторами было исследовано в культурах дрожжей действие тиогликолевой кислоты на продукцию эргостерина и на окислительно-восстановительный потенциал. Они установили, что тиогликолевая кислота, — в качестве агента, сильно уменьшающего окислительно-восстановительный потенциал культур — приблизительно удваивает выход эргостерина. Выяснение биохимического механизма данного процесса проводится в настоящее время.

THE ACTION OF REDOX-SYSTEMS ON THE METABOLISM OF MICROORGANISMS

III. Effect of thioglycolic acid on the ergosterine production in yeast cultures

The effect of thioglycolic acid on esgosterine production and on the oxydation-reduction potential was examined in yeast cultures, and it was found that thioglycolic acid — as an agent lowering considerably the oxydation-reduction potential of cultures — approximately doubles the yield of ergosterine. The clearing up of the biochemical mechanism of the process is in progress.

ANDRÁS KRÁMLI Szeged, Tömörkény u. 2/c. Ungarn.

JUDIT LANTOS, Szeged, Somogyi u. 6. Ungarn.

DIE WIRKUNG VON REDOXSYSTEMEN AUF DEN STOFFWECHSEL VON MIKROORGANISMEN

IV. VERÄNDERUNG DER RIBOFLAVINPRODUKTION IN GESCHÜTTELTEN KULTUREN VON *EREMOTHETIUM ASHBYII*

A. KRÁMLI und A. SZABÓ

CHEMISCHES UND BIOCHEMISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, SZEGED
(VORSTAND: A. KRÁMLI)

(Eingegangen am 17. Februar 1955.)

Zusammenfassung

Bei der Untersuchung der Riboflavinproduktion und der Redoxpotentialwerte von *Eremothetium ashbyii*-Kulturen ergab sich, dass die Produktion in die Phase des erhöhten Redoxpotentialwertes fällt.

Behandlung der produzierenden Kulturen mit jungen Kulturen, d. h. mit Systemen, in denen die RP-herabsetzenden Faktoren laufend produziert werden, hatte eine zeitliche Verlängerung der Anstiegsphase der RP-Kurve und dadurch eine gesteigerte Riboflavinproduktion zur Folge.

Es ist bekannt, dass zahlreiche Mikroorganismen das Riboflavin als Stoffwechselprodukt produzieren. Besonders bei *Eremothetium ashbyii* und *Ashbyia gossipii* ist nach Literaturangaben die Riboflavinproduktion eine sehr beträchtliche (manchmal zwischen 400 und 1000 Gamma/ml) [7, 9].

Diese Mikroorganismen sind auch für die industrielle Herstellung des Riboflavins geeignet. Insbesondere seit der Darstellung der Antibiotika in grossindustriellem Massstabe hat die Fermentationstechnik eine ausserordentliche Entwicklung erfahren und zwar um so mehr, als das Rohmaterial vorwiegend aus Abfällen der Landwirtschaft hervorgeht.

Zur Herstellung des Riboflavins werden heute gelüftete Kulturen des *Eremothetium ashbyii*-Stammes besonders verwendet, deren Produktionsfähigkeit vornehmlich durch Auswahl der optimalen Nährböden bzw. durch fortlaufenden Ersatz derselben während der Fermentation gesteigert werden kann.

Frühere Versuche hatten ergeben, dass der Stoffwechsel von Mikroorganismen durch künstliche Abänderung des Redoxpotentials (RP) der Kulturen gesteigert werden kann [4]. Wir stellten auch fest, dass die RP-Kurve gewisser Mikroorganismen hinsichtlich ihres Stoffwechsels drei charakteristische Abschnitte unterscheiden lässt: der erste, in dem das RP sinkt, entspricht der Wachstumsphase, und der zweite, wo das RP steigt, kann als Produktionsphase bezeichnet werden, da die Anreicherung der Stoffwechselprodukte der Zelle im Nährboden gerade in diese Zeit fällt. In der dritten Phase, wo das RP konstant ist, findet schon keine weitere Vermehrung der Stoffwechselprodukte mehr statt. Überdies fanden wir, dass für die Zunahme eines Stoffwechselproduktes

ein bestimmtes Intervall im ansteigenden Teil der RP-Kurve charakteristisch ist. Soll also die Entstehung eines bestimmten Stoffwechselproduktes gesteigert werden, so muss die Produktionsphase der Kultur verlängert werden. Dies ist gewöhnlich durch Eintragen von RP-herabsetzenden Substanzen in die Kultur zu erreichen,welche die Funktionen der die Synthese der Stoffwechselproduktion steuernden Enzyme nicht hemmen. Nach früheren Untersuchungen wird durch in die Kultur eingetragene Fremdsubstanzen das RP der Kultur in Abhängigkeit davon verändert, ob dieselben von den Zellen gebunden werden oder nicht [5]. Im letzteren Falle wird die von den Fremdkörpern verursachte RP-Veränderung von der Kultur ausgepuffert, da die Redoxkapazität der eingeführten Stoffe — verglichen mit der der Zellen — gewöhnlich verschwindend klein ist.

Diese Beobachtung liess daran denken, dass eine Verlängerung der Produktionsphase eventuell durch Mischen der bereits produzierenden Kultur mit einer jüngeren Kultur zu erreichen sei, welche die RP-herabsetzenden Faktoren laufend produziert, und dass — da das RP der Kultur sozusagen die Resultante der durch sämtliche in ihr vorkommenden Redoxsysteme zustandegebrachten Redoxpotentiale ist — das RP der Kultur auf die Einwirkung der jungen Kultur sinken müsste, wobei die Produktionsphase verlängert werden könnte. Auf Grund dieser Erkenntnis versuchten wir in gelüfteten *Eremothetium ashbyii*-Kulturen eine Steigerung der Riboflavinproduktion nach diesem Prinzip herbeizuführen.

Methoden

Die Kulturen wurden in mit Watte umwickelten Aluminiumstopfen verschlossenen Erlenmeyerkolben von 1 Liter Inhalt hergestellt. In den vier Bohrungen der Aluminiumstöpsel befanden sich die Elektroden zur RP-Messung, das Lüftungsrohr und die Vorrichtung zur Probeentnahme. Die Lüftung der an einem magnetischen Pendel-Schüttelapparat geschüttelten Kulturen besorgte ein kleiner elektrischer Membrankompressor, zur RP-Messung bedienten wir uns einer Platin- oder Goldelektrode — gegenüber einem Kalomel geschaltet. Die Verbindung zwischen Kalomelelektrode und Kulturboden vermittelte ein am unteren Ende mit einem Tonplättchen verschlossenes, mit KCl-Agar beschicktes Glasrohr. (Die Messungsergebnisse beziehen sich auf 2 n Wasserstoffelektrode.)

Die entstandene Riboflavinmenge wurde mit der modifizierten Methode von KOSCHARA [3] kolorimetrisch bestimmt und kristallinisch isoliert. Sämtliche Versuche wurden in einer Thermostat-Kammer bei 24° C durchgeführt.

Versuche

Zu den Versuchen benutzten wir den uns vom Budapester Staatlichen Institut für Volksgesundheitswesen zur Verfügung gestellten *Eremothetium ashbyii*-Stamm.

Nährboden: 25 g Mutterhefe III. Gen. wurden in 100 ml dest. Wasser gelöst, 20 Minuten lang bei 2 ATÜ im Autoklav autolysiert und nach dem Erkalten der überstehende klare Teil zur Nährbodenbereitung dekantiert oder filtriert.

Zusammensetzung des Nährbodens :

20 ml Hefeextrakt
80 ml dest. Wasser
0,5 g Pepton
2,0 g Glukose

Nach Einstellen des pH mit Natronlauge auf 7,0 wurden je 100 ml in 1 Liter-Kolben 15 Minuten bei 110° C sterilisiert ; die Beimpfung geschah mit 5 ml, in demselben Nährboden vorgezüchtetem Mycelieninokulum. Temperatur 23,5—24° C. Inkubationsdauer, je nach dem RP, 8—10 Tage.

Die Riboflavinmenge wurde auf Grund von Literaturangaben [3, 6, 8] folgendermassen bestimmt :

Die zweitäglich entnommenen 10 ml-Proben wurden mit Schwefelsäure angesäuert (pH 2,0) und unter stetem Rühren solange mit Kaliumpermanganat versetzt, bis ein grosser Teil des $KMnO_4$ zersetzt war und dann das überschüssige $KMnO_4$ mit 3%-igem Wasserstoffperoxyd zersetzt. Nach dem Filtrieren wurde die Lösung über eine Terra silicia-Säule geschüttet, welche das Riboflavin adsorbierte und die Eluierung mit einem Aethanol-Pyridin-Essigsäuregemisch (3 : 1 : 1) vorgenommen. Die Farbintensität der erhaltenen gelben Lösung wurde — je nach der Produktion entsprechend verdünnt — im Pulfrich-Photometer bei 10 mm Schichtdicke und Filter »S 47« bestimmt und die Riboflavinmenge auf Grund der Extinktion an Hand einer mit Riboflavinlösungen bekannter Konzentrationen hergestellten Kalibrationskurve berechnet.

Darstellung des kristallinen Riboflavins. Für die Isolierung des Riboflavins sind mehrere Methoden bekannt [1, 2]. Wir hielten uns an die bei der quantitativen Riboflavinbestimmung angegebenen Grundsätze. Das Riboflavin wurde in saurem Milieu an einer Terra silicia-Säule adsorbiert und mit einem Aethanol-Pyridin-Essigsäuregemisch (3:1:1) eluiert, das Eluat bei 4° C im Vakuum eingedampft und der erhaltene Rückstand aus verdünnter Essigsäure umkristallisiert, wobei 70—80% der photometrisch nachgewiesenen Menge in kristallinem Zustand isoliert werden konnten.

Zusammenhänge zwischen RP und Riboflavinproduktion. Wie bereits mitgeteilt, beginnt die Diffusion der Stoffwechselprodukte gewisser Mikroorganismen in den Nährboden, wenn das RP der Kultur ansteigt. Bei unseren Kulturen war dies am dritten Tage der Fall. Die Zusammenhänge zwischen RP und Riboflavinproduktion veranschaulicht Abbildung 1, aus der erhellt, dass während der Herabsetzung des RP nur eine minimale Riboflavinproduktion zu verzeichnen ist. Mit dem Ansteigen der RP-Kurve steigt auch die Riboflavinproduktion und zwar solange, bis der RP-Wert konstant wird.

Das Ziel unserer Verusche war, durch Verlängerung der Produktionsphase eine Steigerung der Riboflavinproduktion zu erreichen. Deshalb wurden am dritten Tage der Inkubation, als das RP der Kulturen zu steigen begann, die

produzierenden Kulturen mit der gleichen Menge einer jüngeren (1 Tag alten) Kultur steril vermischt und das RP täglich und die Riboflavinmenge zweitäglich bestimmt. Als Kontrolle diente eine ähnliche, aber mit junger Kultur nicht versetzte Kultur. Die Zusammensetzung der gemischten und Kontrollkulturen wurde auch analytisch untersucht und durch entsprechende Dosierung

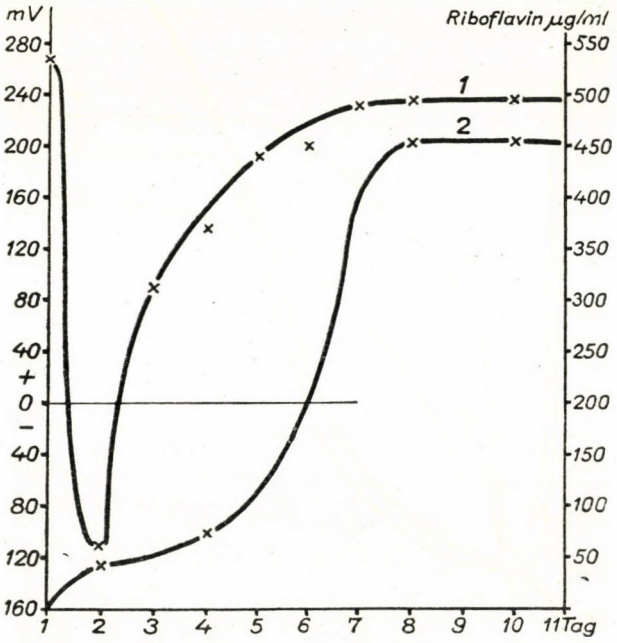


Abb. 1. Veränderung des Redoxpotentials (1) und der Riboflavinproduktion (2) in gelüfteten und geschüttelten Kulturen von *Eremothetium ashbyii*

für vollkommene Übereinstimmung gesorgt. So konnte die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass die Produktionssteigerung eventuell als Folge eines Nährbodenüberschusses zustande kam. Die Versuchsergebnisse sind in Abbildung 1 wiedergegeben.

Abbildung 1 zeigt, dass sofort nach dem Vermischen der beiden verschieden alten Kulturen eine RP-Senkung eintrat und der RP-Wert während der ganzen Inkubationsdauer den der Kontrollkultur nicht wieder erreichte. Gleichzeitig war auch eine Verlängerung der Produktionsphase festzustellen, da die RP-Veränderung in den gemischten Kulturen erst am zehnten Tage aufhörte, während in den Kontrollen das RP schon am achten Tage stabil ward. Dementsprechend gestaltete sich auch die Riboflavinproduktion länger: während sie in den Kontrollkulturen ihr Maximum schon am achten Tage erreichte (464 Gamma/ml), hörte sie in den Mischkulturen erst am zehnten Tage — mit einem Maximum von 652 Gamma/ml — auf.

So kann also die mit RP-Messungen nachweisbare Produktionsphase verlängert und dadurch eine Verlängerung der Inkubationsdauer um 2—3 Tage erreicht werden.

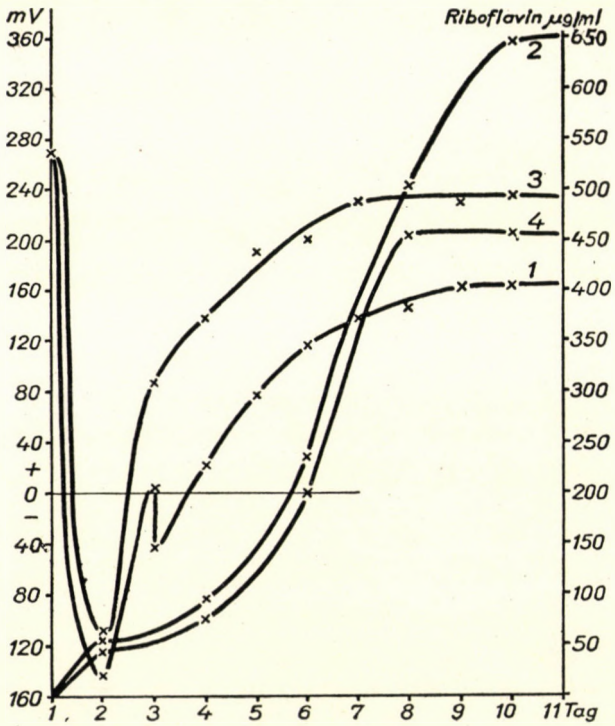


Abb. 2. Veränderung des Redoxpotentials und der Riboflavinproduktion in mit jungen Kulturen vermischten, gelüfteten *Eremothetium ashbyii*-Schüttelkulturen. 1. RP-Veränderung der mit einer jungen Kultur behandelten *Eremothetium ashbyii*-Kultur. 2. Riboflavinproduktion in der behandelten Kultur. 3. RP-Veränderung einer Kontrollkultur. 4. Riboflavinproduktion in der Kontrollkultur. Die Knickung der Kurve entstand zur Zeit der Zugabe der jungen Kultur.

LITERATUR

1. Dale, J. K. (1947) Crystalline riboflavin. U. S. Patent 2, 421, 142 (27, 5, 1947).
2. Hichey, J. R. (1946) Precipitation of riboflavin from aqueous solution by bacteriological reduction. *Arch. Biochem.*, **11**, 259—267.
3. Koschara, W. (1935) Über Harnlyochrome. *Z. physiol. Chem.*, **232**, 101—116.
4. Krámli, A. (1954) Redoxpotenciál mint indikátor mikroorganizmusok anyagcserevizsgálatánál. Redox potential as indicator in examining metabolism of microorganisms. *Biol. Közl.*, **2**, 7—21. (Ungarisch, englische Zusammenfassung.)
5. Krámli, A., Lantos, J., Stur, J. (1954) Redoxrendszerek hatása mikroszervezetek anyagcseréjére. II. The effect of redox systems on the metabolism of microorganisms. II. *Biol. Közl.*, **2**, 23—27. (Ungarisch, englische Zusammenfassung.)
6. Lunde, G., Kringstad, H., Olsen, A. (1939) Über die Bestimmung des Laktoflavins (Vitamin B_2) in Naturprodukten. *Z. physiol. Chem.*, **260**, 141—147.
7. Pridham, T. G. (1951) Biological production of riboflavin. U. S. Patent, 2, 578, 738 (18, 12, 1951).

8. TATSUO, K., KATSUO, T. (1946) A simple determination of riboflavin, *Igaku to Seibutsugaku* (*Med. &. Biol.*), **9.**, 135—136.
9. WICKELHAM, L. J., FLICKINGER, M. H., JOHNSTON, R. M. (1946) The production of riboflavin by *Ashbya gossypii*. *Arch. Biochem.*, **9.**, 95—98.

ДЕЙСТВИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ СИСТЕМ НА ОБМЕН ВЕЩЕСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ

IV. Изменение продукции рибофлавина во взболтанных культурах *Eremothetium ashbyii*

При исследовании продукции рибофлавина и величин окислительно-восстановительного потенциала культур *Eremothetium ashbyii* было установлено, что продукция происходит в фазе повышенной величины окислительно-восстановительного потенциала.

Обработкой продукцирующих культур молодыми культурами, то есть системами, в которых непрерывно производятся факторы, уменьшающие окислительно-восстановительный потенциал, удалось продлить фазу подъема кривой окислительно-восстановительного потенциала, вследствие чего получилось повышение продукции рибофлавина.

THE ACTION OF REDOX-SYSTEMS ON THE METABOLISM OF MICROORGANISMS

IV. The change of riboflavine production in shaken cultures of *Eremothetium ashbyii*

In the investigation on the riboflavine production and the oxydation-reduction potential values of *Eremothetium ashbyii* cultures it was proved that the production falls into the phase of the enhanced oxydation-reduction potential value.

Treatment of the producing cultures with young cultures, i. e. with systems in which the factors that lower the oxydation-reduction potential are currently produced, resulted in a temporal prolongation of the ascending phase of the oxydation-reduction potential curve and thereby in increased riboflavine production.

ANDRÁS KRÁMLI, Szeged, Tömörkény u. 2/c. Ungarn.
ALEXANDER SZABÓ, Salgótarján, Megyei kórház, Ungarn

ALGENTERATOLOGIEN IM SESTON DES BALATON UND IHRE ENTWICKLUNGSGESCHICHTLICHEN BEZIEHUNGEN

T. HORTOBÁGYI

INSTITUT FÜR BOTANIK DER PÄDAGOGISCHEN HOCHSCHULE, EGER (VORSTAND: T. HORTOBÁGYI)

(Eingegangen am 18. März 1955)

Zusammenfassung

Im Jahre 1942—43 wurden aus den offenen Gewässern mit sandigem Grund von Balatonboglár Seston gesammelt. Die Untersuchung ergab, dass von 402 verschiedenen Organismen 14, d. h. 3,5% Missbildungen aufwiesen.

Die meisten abweichenden Formen gehören zum Genus *Pediastrum*. Unter ihnen steht an erster Stelle die Art *P. simplex*, obwohl diese nicht die am häufigsten vorkommende Art des Genus im Balaton ist. Jedes fünfte Exemplar des Sestons aus offenen Gewässern und jedes dritte-vierte Exemplar des Sestons des Hafens zeigt irgendeine Abnormität, obwohl die Zönobien von verminderter Zellzahl nicht zu Abnormitäten gezählt wurden. Die *Pediastrum*-Abnormitäten wurden in acht Typen eingeteilt. Die Hälfte der Teratologien hatte Zönobien von 16 Zellen, fast ein drittel 8 Zellen, und ein fünftel Zönobien von 32 Zellen.

Die Abnormitäten der *Crucigena quadrata* var. *octogona* f. *pulchra* zeigten sich im Hervorschwellen der äusseren Teile der Zellen. Die *Scenedesmus*-Abnormitäten können in vier Typen eingeteilt werden. Die Dornen des *Tetrastrum staurogeniaeforme* sind in der Zahl vermindert und gebogen. In einer Kolonie von *Gloeoactinium limneticum* zeigten die Zellen vom Normalen abweichende Formen. Ein Fortsatz von *Staurastrum gracile* fehlte. *Lyngbia limnetica* hatte unregelmässige Fadenwindung.

Alle Abnormitäten kamen mit Ausnahme von zwei in der Ordnung Chlorococcales vor. Diese Ordnung ist in allen Monaten die artenreichste und hierher gehören jene Genera des Balaton, die die grösste Variabilität zeigen. Diese grosse Variabilität der Chlorophyceen spricht dafür, dass sie jüngerer Ausgestaltung sind und eine grössere Anpassungsfähigkeit besitzen, als die Cyanophyceae, Euglenophyceae, Chrysophyceae und Dinophyceae. Die grosse Individuenzahl bedingt nicht eine grössere Zahl der Abnormitäten, nicht einmal das Vorkommen überhaupt von Abnormitäten. Die Algen, die Abnormitäten aufwiesen, gehören nicht zu den mit vielen Individuen auftretenden Leitformen des Balaton. Es ist auffallend, das an den Pflanzen, die quantitativ dominieren, keine Missbildungen gefunden werden konnten (*Gomphosphaeria lacustris*, *Ceratium hirundinella*, *Phacotus lenticularis* usw.).

Im Laufe der Bearbeitung unserer Sestonsammlungen, die im freien Wasser mit sandigem Grund bei Balatonboglár in den Jahren 1942—43 gemacht wurden, haben wir die Algenabnormitäten mit besonderer Aufmerksamkeit verfolgt. Der Balaton (Plattensee) verfügt nicht nur in qualitativer Beziehung — es wurden 402 verschiedenartige Mikroorganismen gefunden —, sondern auch auf dem Gebiet der Abnormitäten über ein bemerkenswertes Material, wie dies auch aus der Tabelle 1 ersichtlich ist [7—10].

Bei 3,5% von den im Seston festgestellten Arten wurden Abnormitäten beobachtet. Die Abnormitäten kamen — mit Ausnahme eines einzigen Exemplars einer einzigen Art — im Stamm *Chlorophyta* vor.

Tabelle 1

Verteilung der Abnormitäten nach Algengruppen

Algengruppe	Artenzahl des Sestons im Sammeljahr	Zahl der Abnormitäten aufweisenden Arten
Cyanophyta	58	1
Euglenophyta	83	—
Chrysophyta, Xanthophyceae	4	—
« Chrysophyceae	10	—
« Bacillariophyceae	42	—
Pyrrophyta, Cryptophyceae	1	—
« Dinophyceae	11	—
Chlorophyta, Chlorophyceae	165	12
« Conjugatophyceae	27	1
Adelomycetes	1	—
	Total 402	14

Wird innerhalb der Teratologien aufweisenden Arten die Zahl der Abnormitäten in Betracht gezogen, so ergibt sich, dass die Teratologien am häufigsten zu Beginn des Sommers, im Juni und im Juli vorkommen. Dieser Zeitabschnitt bietet auch vom Gesichtspunkt der Artenerscheinung die optimalsten Lebensbedingungen. Die verschiedenartigsten Algen kamen im Laufe des Jahres im Juli vor: 223. Die kleinste Algenartenzahl wurde im Januar beobachtet: 78. Im Februar kamen 86 Mikroorganismen vor, ihre Vermehrung beginnt eben um diese Zeit. In diesem Monat wurde keine einzige Teratologie aufweisende Alge angetroffen. Die Zahl der Abnormitäten ist auch im Mai (4) und September (4) äusserst gering. Spätsommer und Herbst weisen die wenigsten Abnormitäten auf. Die Häufigkeit der Teratologien bedeutet aber nicht, dass sich die Abnormitäten gleichzeitig auch auf vielerlei Algen finden. Die Erscheinung trat im Juni auf zweierlei, im Juli auf viererlei Algen auf, obgleich Teratologien zu dieser Zeit in grösster Zahl in der Plankton, Seston vorkamen. Abnormitäten wurden auf den verschiedenartigsten Pflanzen, u. zw. auf fünf Arten im Dezember, Januar und März beobachtet, gleichzeitig war die Zahl der Abnormitäten 12, 6 bzw. 5, bloss ein Bruchteil der vom Juni und Juli.

Tabelle 2 zeigt die Zahl der Abnormitäten und ihre periodische Erscheinung.

Es ist auffallend, dass man im Seston vom Juli—Oktober bloss *Pediastrum* Teratologien begegnet. Der Verfasser behandelt die *Pediastrum*-Arten nach der Auffassung BIGEARD [1]. Nach dem System von BRUNNTHALER [2] werden unter dem Namen *Pediastrum simplex* MEYEN die folgenden zusammengefasst: *P. clathratum* (SCHROETER) LEMM., *P. clathratum* var. *duodenarium* (BAILEY) LEMM., *P. clathratum* var. *microporum* LEMM., *P. simplex* (MEYEN p. p.) LEMM. und *P. simplex* var. *radians* LEMM. — Im Falle von *P. duplex* MEYEN handelt es sich laut BRUNNTHALER um die Form »var. *reticulatum* LAGERH.« *P. tetras* (EHR.) RALFS ist die BRUNNTHALERsche Form »var. *excisum* RABENH. f. a. W. ET W.«

Tabelle 2

Zahl der Abnormitäten und ihre Verteilung nach Monaten

Art	Abnormitätenzahl im Monat										Insgesamt
	VII.	VIII.	IX.	X.	XII.	I.	II.	III.	V.	VI.	
Cyanophyta											
1. *Lyngbya circumcreta* G. S. West	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1
Chlorophyceae											
2. *Pediastrum simplex* Meyen	Viele	2	1	1	1	1	—	—	—	—	Viele
3. *Pediastrum duplex* Meyen	4	—	1	—	—	—	—	—	1	—	6
4. *Pediastrum Boryanum* (Turp.) Menegh	6	3	1	4	8	2	—	3	2	2	31
5. *Pediastrum tetras* (Ehr.) Ralfs	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	2
6. *Scenedesmus crassus* Chod.	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1
7. *Scenedesmus falcatus* Chod.	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1
8. *Scenedesmus armatus* var. *Chodati* Smith	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1
9. *Scenedesmus armatus* var. *boglàriensis* Hortob.	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	2
10. *Scenedesmus quadricauda* Chod.	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1
11. *Crucigenia quadrata* var. *octogona* f. *pulchra* Hortob.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Viele	Viele
12. *Tetrastrum staurogeniaeforme* (Schroed.) Lemm.	—	—	—	—	—	1	—	2	—	—	3
13. *Gloeoactinium limneticum* G. M. Smith	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1
Conjugatophyceae											
14. *Staurastrum gracile* Ralfs	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1
Gesamtzahl	Viele	5	4	5	12	6	—	8	4	Viele	—

Auf dem Gebiet der Abnormitäten fiel unter den *Pediastrum*-Arten dis Art *P. simplex* auf. Im freien Wasser wies jedes fünfte, im Hafenseston jededritte bis vierte Exemplar eine Abnormität auf (obwohl die Zönobien mit kleinerer Zellenzahl nicht als Abnormität angesehen wurden). Es ist auffallend, dass während in der häufigsten *Pediastrum*-Art des Monats Juli, in der 1,3% des Phytosestons bildenden Art *P. duplex* insgesamt 4, in der 0,7% ausmachenden Art *P. Boryanum* 6, in der 0,2% der Algen ausmachenden *P. simplex* so überaus viele Teratologien vorkamen. In dem vorhergehenden Monat Juni wurde keine einzige *Pediastrum*abnormität beobachtet. Im August wurden — obwohl *P. simplex* 0,6% des Phytosestons bildete — bloss zwei abweichend ausgestaltete Zönobien beobachtet.

Die *Pediastrum*abnormitäten des Balaton können in 8 Typen gereiht werden :

1. Die Randzellen sind durch eine oder mehrere fortsatzlose oder mit wenigen Fortsätzen versehene Zellen unterbrochen. Dieser Typ kann zwei Untertypen haben :

a) eine oder mehrere innere fortsatzlose Zellen keilen sich zwischen die Randzellen ein (Abb. 1—2). Dies ist die häufigste Abnormität. Die Ursache

besteht in der fehlerhaften Anordnung der Zellen im jugendlichen Alter. Nachdem die Mutterzellenteilung beendet ist, bewegen sich nämlich die von der Mutterzelle befreiten, noch in der Hülle befindlichen jungen Zellen mehr oder minder lang ziemlich lebhaft, und in diesem Entwicklungszustand tritt der Platzwechsel ein. Die inneren- und Randzellen sondern sich schon in diesem Zustande ab.

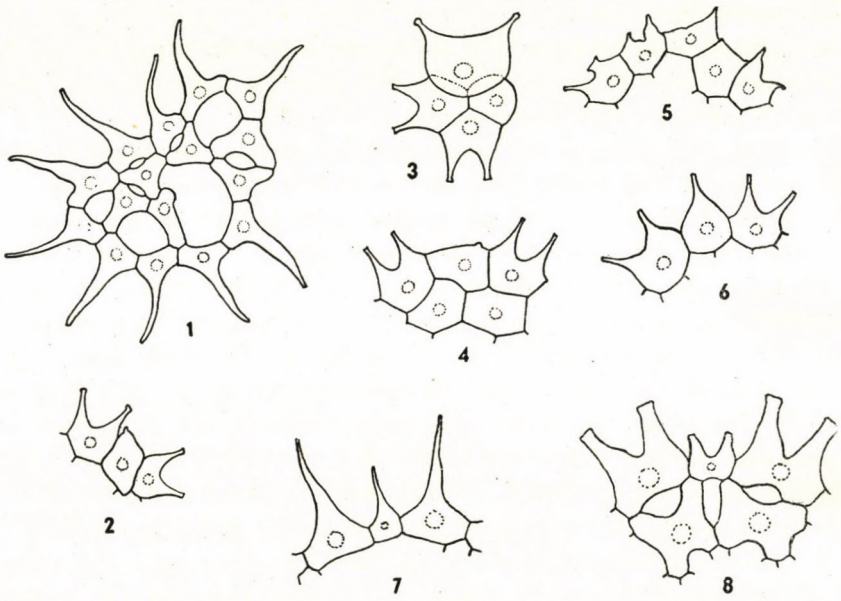


Abb. 1. Pediastrum simplex MEYEN, 700 ×, *2—5. Pediastrum boryanum* (TURP.) MENEGH. 1000 ×, *6. Pediastrum boryanum* (TURP.) MENEGH. 600 ×, *7. Pediastrum simplex* MEYEN. 700 ×, *8. Pediastrum duplex* MEYEN, 700 ×

b) Der Fortsatz einer oder mehrerer Zellen entwickelt sich nicht oder bildet sich nur teilweise aus (Abb. 3—4). Bedeutend seltener als die vorige. Hier besteht schon eine tiefergehende Ursache, die Abnormität lässt sich auf die ungenügende Wirksamkeit des Plasmas zurückführen. Diese Erscheinung dürfte eine atavistische Abnormität sein : ein Rückschlag zum Urzustand, zu den gleichförmigen fortsatzlosen Ahnen, zu den Formen der Typen *P. muticum* KÜTZ oder *P. integrum* NÄG.

2. Die Zönobienzellen sind vielförmig (Abb. 5—6). Es wurden mehrere Kolonien gefunden, deren Zellen zweierlei oder dreierlei Typen aufwiesen. So waren z. B. auf einem *P. Boryanum* im Juli ausser den charakteristischen Zellen auch die typischen Zellen von „var. *brevicorne* A. BR." und „*P. muticum*" KÜTZ anwesend. Auf dem Zönobium von *P. Boryanum* waren auch Zellen vom Typ

P. simplex nicht selten. Ebenso konnten Zellen vom Typ *P. simplex* in den Kolonien von *P. duplex* festgestellt werden. In solchen Zönobien sind auch die Übergangsformen sehr häufig.

3. Eine oder mehrere der äusseren Zellen sind Zwergzellen (Abb. 7—8). Zwergzellen konnten in den inneren Zellen nie beobachtet werden. Der zwerghafte Wuchs der äusseren Zellen ist die Folge eines uns unbekannten Faktors. Laut unseren auf lebendem Material durchgeführten Untersuchungen offenbart sich das kleine Mass einer oder mehrerer Zellen des Zönobiums schon zur Zeit, wo das junge Zönobium noch von der Mutterzellenhülle umgeben ist. Im Vergleich zu den normal grossen Zellen bleiben diese kleinen Zellen im Laufe ihres späteren Wachstums bedeutend zurück.

4. Eine oder mehrere der inneren Zellen ahmen die äusseren, mit Fortsätzen versehenen Zellen nach (Abb. 9). Die Zahl der äusseren und inneren Zellen ist in diesem Falle normal, weder grösser noch kleiner als gewöhnlich. Diese Abnormitätenart weist auf eine Beziehung mit der *Soriastrum*-Gattung hin.

5. Eine oder mehrere der äusseren und inneren Zellen wechseln ihren Platz (Abb. 10). Anordnungsfehler. Scheinbar identische Abnormität mit der des ersten Typs. Während aber beim ersten Typ die Randzellenzahl die normale Zahl um eine oder mehrere Zellen übertrifft (Untertyp *a*) oder aber die Zahl der Randzellen normal ist, wobei aber nicht sämtliche mit Fortsätzen versehen und sämtliche inneren Zellen fortsatzlos sind (Untertyp *b*), sind in den zum 5. Typ gehörigen Abnormitäten eine oder mehrere der inneren Zellen mit Fortsätzen versehen und eine oder mehrere der äusseren Zellen fortsatzlos.

6. Auf den Zellen erscheinen überzählige Fortsätze (Abb. 11). Prospektive Veränderung. Im Falle von *P. simplex* gegen die Arten vom Typ *P. boryanum*, *P. duplex*. Im Falle der mit zwei Fortsätzen versehenen Arten gegen den Typ *P. biradiatum* MEYEN. In der Pediastrum-Gattung dürften die fortsatzlosen Arten, in denen kein nennenswerter Unterschied zwischen den äusseren und inneren Zellen besteht, die älteren Arten darstellen. Der Entwicklungsweg führt von den fortsatzlosen Arten zu den mit einem, zwei bzw. mehreren Fortsätzen versehenen Arten.

7. Zwei Schwärmer wachsen zusammen. Entwicklungsanomalie. Die zusammengewachsenen Zellen sind in allen Fällen bedeutend grösser als die übrigen Zellen ; die Zellenzahl des Zönobiums ist in solchen Fällen immer um eine Zelle geringer (Abb. 12). Es wurde aber bloss das Zusammenwachsen von zwei Zellen beobachtet. Innerhalb eines einzigen Zönobiums sind niemals mehr als zwei Zellen zusammengewachsen.

8. Die Zönobiumzellen bilden einen straussartigen Haufen. Diese Abnormität hat auf den ersten Blick viel Ähnlichkeit mit den Arten der *Coelastrum*-Gattung oder im Falle von Zellen mit mehreren Fortsätzen mit denen der *Sorastrum*-Gattung. Die normalen zweidimensionierten *Pediastrum*-Kolonien werden zu dreidimensionierten. Prospektive Veränderung.

In ein und demselben Zönobium können auch mehrere Abnormitätstypen erscheinen!

Die Reihenfolge der *Pediastrum*-Abnormitäten, der Veränderungen, bezeichnet gleichzeitig ihre Häufigkeit. Neben der Abnormität vom Typ 1 — genauer Typ 1 *a* — bleiben alle übrigen zusammen weit zurück. Die Hälfte der Abnormitäten trat auf 16zelligen, beinahe ein Drittel auf 8zelligen und ein Fünftel auf 32zelligen Zönobien auf. Auf 4- und 64zelligen Kolonien sind

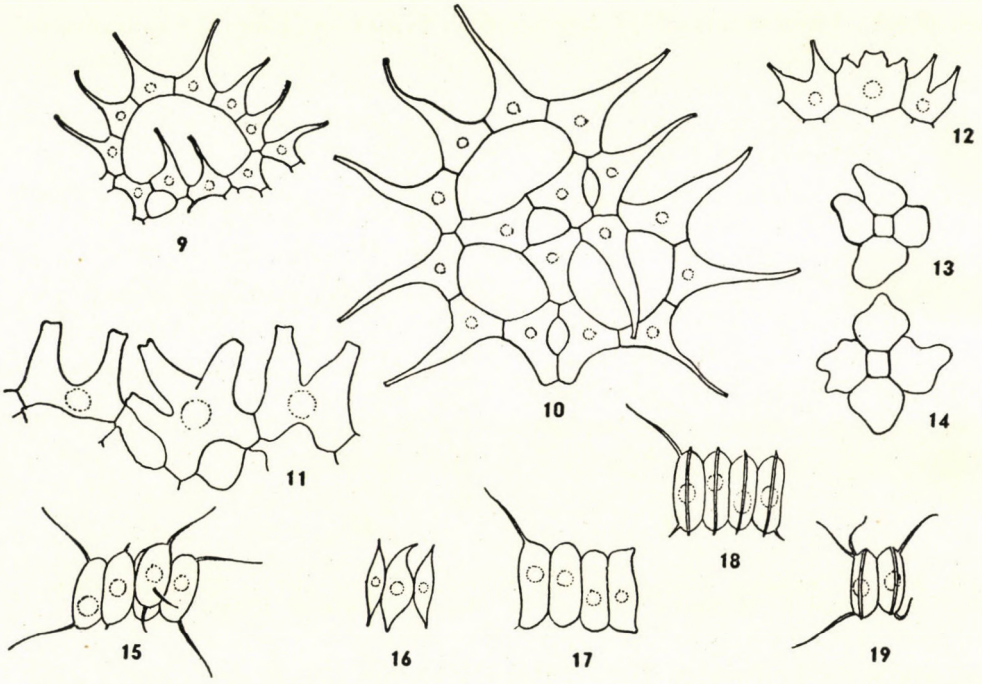


Abb. 9. Pediastrum simplex MEYEN, 700 ×, *10. Pediastrum simplex* MEYEN, 1000 ×, *11. Pediastrum duplex* MEYEN, 1000 ×, *12. Pediastrum boryanum* (TURP.) MENEGH. 1000 ×, *13—14. Crucigenia quadrata* var. *octogvna* f. *pulchra* HORTOB. 1500 ×, *15. Scenedesmus armutus* var. *Chodati* SMITH. 1500 ×, *16. Scenedesmus crassus* CHOD. 700 ×, *17. Scenedesmus quadricauda* CHOD. 600 ×, *18—19. Scenedesmus armatus* var. *boglàriensis* HORTOB. 1500 ×

Abnormitäten äusserst selten. Auf dem Sammelort waren die 16- und 8zelligen Zönobien die häufigsten, die seltensten waren die 4zelligen.

Nach BIGEARD kann die Lebensweise (pelagisch, benthisch usw.) und das Alter der Kolonien die Zellen stark verändern. Dies kann nach ihm in solchem Ausmass geschehen, dass sie den Anschein von verschiedenen Arten erregen [1, p. 109]. Es scheint uns allerdings richtiger, seine Feststellungen so zu formulieren, dass die Veränderungen unter der Einwirkung von verschiedenen Umweltfaktoren (chemischer Zustand, Nahrung, Lichtverhältnisse, Fluktuation usw.) entstehen. Übrigens bestätigen die Balatoner Beobach-

tungen in vollem Ausmass die auf die überaus grosse Variabilität der *Pediastrum*-Arten bezüglichen Feststellungen von BIGEARD.

Überraschend waren im Seston des freien Wassers von Balatonboglár im Juni die vielen teratologischen Formen von *Crucigenia quadrata* var. *octogona* f. *pulchra*. Die Zellwand schwoll auf einem bestimmten Platz auffallend hervor, worin das Plasma ± eindrang (Abb. 13—14). In solchen Zellen konnte niemals eine Autosporenbildung wahrgenommen werden. Aller Wahrscheinlichkeit nach ist dies ein durch Bakterien (Zelluloseabbauer?), möglicherweise auch durch Viren verursachtes degeneratives Symptom. Eine Algenpilzansied-

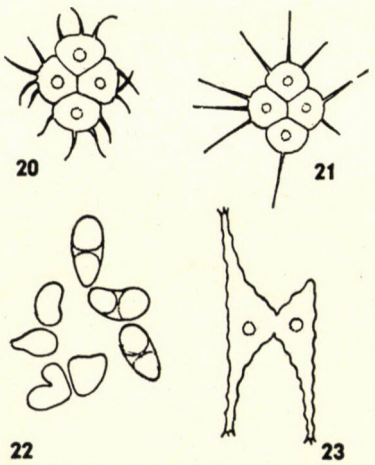


Abb. 20—21. Tetrastrum staurogeniaeforme (SCHROED.) LEMM. 800 ×, *22. Gloeoactinium limneticum* G. M. SMITH. 2000 ×, *23. Staurastrum gracile* RALFS. 500 ×

lung wurde nie beobachtet. Diese Pflanze vermehrt sich in der grössten Zahl im Juni, sie bildet 3% der Algen des Phytosestons und 23,1% der Chlorophyzeen. Diese Pflanze kann, mit Ausnahme von Dezember—März gesammelt werden, ihre abnormen Exemplare wurden jedoch bloss im Juni gefunden.

Scenedesmus-Teratologien wurden in den Winter- und in den frühen Frühlingsmonaten angetroffen, obwohl die Individuenzahl in den Sommer- und Herbstmonaten am höchsten ist. Die *Scenedesmus*-Abnormitäten können in vier Typen eingereiht werden :

1. Die Zellenzahl der Zönobien ist grösser (Abb. 15). Die diese Erscheinung hervorrufende Ursache besteht in der überzähligen Teilung einer oder mehrerer der in den Mutterzellen befindlichen Autosporen. Es wurden grösstenteils 5zellige abnorme Zönobien angetroffen.

2. Das Zusammenwachsen der Autosporen bzw. ihre unvollkommene Teilung. In ein und demselben Zönobium wachsen nie mehr als zwei Zellen zusammen. Die auf diese Weise entstandene Zelle ist bedeutend grösser als

die übrigen und die Zellenzahl der Kolonie ist um eine weniger. Dies wurde auf einem 3zelligen Zönobium beobachtet (Abb. 16).

3. Die Reduktion der Dornen bzw. ihre rudimentäre Entwicklung (Abb. 17—18). Die Verringerung der Zahl der auf den Zwischenzellen angeordneten Dornen bzw. ihre unvollkommene Entwicklung ist ebenfalls eine häufige Erscheinung. Viel charakteristischer ist die geringere Zahl der äusseren langen Dornen oder ihre Länge, die kürzer ist als normal. Zumeist fehlt, wie z. B. bei *Scenedesmus quadricauda*, ein langer Dorn (auch auf Grund von in anderen Biotopen durchgeführten Beobachtungen). Die »*bicaudatus*«-Formen können auf solche, gefestigte Dornenreduktionen zurückgeführt werden.

4. Verdoppelung der Dornen. Kann auch auf den äusseren- und Zwischenzellen vorkommen. Auf den äusseren Zellen seltener (Abb. 19).

Diese Reihenfolge weist ebenso wie bei den *Pediastrum*-Arten auch hier auf die Häufigkeit hin.

Die Abnormitäten von *Tetrastrum staurogeniaeforme* beschränken sich auf die gebogene Erscheinung der Dornen und auf ihre verringerte Zahl (Abb. 20—21). Auf gewissen Zellen geht die Dornenreduktion so weit, dass sie förmlich den Anschein einer Zelle von *T. elegans* PLAYF. haben. Von den vier Zellen des Zönobiums kann sich höchstens auf einer einzigen Zelle die Dornenzahl derart reduzieren. Die Dornenlänge von *T. staurogeniaeforme* variiert ausserordentlich. Die Dornenlänge steht in enger Beziehung zu dem Alter der Zelle.

Die einzige abweichende Kolonie der kälteliebenden Art *Gloeoactinium limneticum* wurde im Monat Dezember beobachtet. Die Zellen waren abnormal. Neben den normalen Zellen waren in der Kolonie auch birnen-, nieren- und herzförmige Zellen anwesend. Sie haben sich vermutlich infolge von parasitischen Mikroorganismen derart deformiert (Abb. 22).

Die einzige *Conjugatophyceae*-Abnormität wurde gleichfalls im Dezember beobachtet. Ein Fortsatz von *Staurastrum gracile* fehlte. Entwicklungsanomalie (Abb. 23).

Von den Teratologien der Blaualge *Lyngbya circumcreta* kam uns ein einziges Exemplar unter die Augen. Unregelmässige Fadenwindungen. Maiexemplar.

Vom abnormen Faden des in einem einzigen Exemplar vorkommenden Stammes *Cyanophyta* abgesehen, haben sich die Abnormitäten auf den *Chlorophyta*-Stamm beschränkt. Teratologische Exemplare wurden weder in den 83 Arten zählenden *Euglenophyta*-, noch in den 56 Arten aufweisenden *Chrysophyta*- und in den mit 12 Arten beteiligten *Pyrrophyta*-Stämmen gefunden. Und doch gehören nicht viel weniger Pflanzen (151) zu diesen drei Stämmen als zu den Chlorophytonen (192).

Von zwei Ausnahme abgesehen, kamen in den Grünalgen Abnormitäten bloss in der Ordnung *Chlorococcales* vor. Diese Ordnung wies in sämtlichen

Monaten die grösste Mannigfaltigkeit auf. Ihre Artenzahl ist grösser als die sämtlicher Algengruppen und ihr gehören die variabelsten Gattungen des Balaton an. Im Laufe des ganzen Jahres gehören die Grünalgen übrigens auch quantitative zu den führenden Arten. Diese Veränderlichkeit des *Chlorophyta*-Stammes spricht dafür, dass der Stamm eine jüngere Ausgestaltung ist und ein grösseres Anpassungsvermögen besitzt als die Stämme *Cyanophyta*, *Euglenophyta*, *Chrysophyta* und *Pyrrophyta*.

Es wurden keine Abnormitäten wahrgenommen auf den häufigsten, im Seston des freien Wassers mit sandigem Grund von Balatonboglár lebenden Algen, auf den Pflanzen : *Gomphosphaeria lacustris* CHOD., *Ceratium hirundinella* (O. F. M.) BERGH., *Holopedia irregularis* LAGERH., *Planctonema Lauterborni* SCHMIDLE, *Phacotus lenticularis* (EHR) STEIN, *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) RALFS (die Reihenfolge zeigt gleichzeitig auch die Häufigkeit an), auf den zahlreichen Bacillariophyzeen und auf noch vielen, in weit grösserer Zahl vorkommenden Algen als die Teratologien aufweisenden Organismen. Das Massenvorkommen geht nicht mit einer grösseren zahlenmässigen Erscheinung der Abnormitäten, ja nicht einmal mit dem Vorkommen der Abnormitäten einher. Massenerscheinung und zahlreiche teratologische Exemplare kamen in Balatonboglár in einem einzigen Falle vor. Es ist jedoch zu bemerken, dass die Balatonforschung schon von einigen *Ceratium*-Abnormitäten Kenntnis hat [3, 4].

In bezug auf die teratologischen Algen wurden im toten Arm »Nagyfa« der Theiss schon systematische, sich auf sämtliche Monate des Jahres erstrekkende Untersuchungen auf lebendem und fixiertem Material durchgeführt [5, 6]. Auch dort fiel das Auftreten der Abnormitäten in grossem Ausmass auf die Frühjahrs- und Sommermonate. Im toten Arm »Nagyfa« der Theiss wurden die meisten Algen von abweichender Gestalt im Mai, im Balaton etwas später, im Juni und Juli gefunden. Die überwiegende Mehrzahl der Abnormitäten fiel auch dort auf die *Chlorococcales*-Ordnung der *Chlorophyzeen*. Auch darin stimmen sie überein, dass die meisten Teratologien in der *Pediastrum*-Gattung vorkommen. Während im toten Arm der Theiss *Pediastrum Boryanum* die meisten Abnormitäten aufwies, kamen im Balaton die meisten in der Art *P. simplex* vor. Auch die teratologischen Zönobien von *P. Boryanum* sind im Balaton nicht selten, wogegen im toten Arm »Nagyfa« die *P. simplex*-Abnormitäten äusserst rar sind. Ein ähnliches Verhältnis zeigt sich in den einzelnen *Pediastrum*-Abnormitätstypen (Tabelle 3).

Auch im toten Arm der Theiss übersteigt die Zahl der Teratologien vom Typ 1 bei weitem die Gesamtzahl der übrigen. Auch im toten Arm »Nagyfa« wurden die meisten Abnormitäten auf den 16zelligen Zönobien gefunden (60%). Es folgten die 32zelligen (24%) und die 8zelligen (16%).

Die Untersuchung der Teratologien, das Studium der einen hohen Polymorphismus aufweisenden Arten, trägt mit nützlichen Angaben zur Bestimmung der verwandtschaftlichen Beziehungen der Mikroorganismen bei.

Tabelle 3

Pediastrum-Abnormitäten

Abnormitätstyp	Abnormitätszahl	
	in Balatonboglár	im toten Arm der Theiss
1	Viele	41
2	5	6
3	3	4
4	1	1
5	1	—
6	1	4
7	1	2
8	1	—

SCHRIFTTUM

1. BIGEARD, E. (1933) Les *Pediastrum* d'Europe. *Trav. Labor. Bot. Univ. Catholique d'Angers*, **5**, 1—174.

2. BRUNNTHALER, J., LEMMERMANN, E., PASCHER, A. (1915) Chlorophyceae II. Süsswasser-Flora, **5**, Jena.

3. ENTZ, G. JUN. (1904) Beiträge zur Kenntniss des Planktons des Balatonsees. In *Resultate der wissenschaftlichen Erforschung des Balatonsees.* Hőlzel, Wien. **2**/1, 1 Anhang, 1—37.

4. FRANCÉ, R. (1897) Protozoen. In *Resultate der wissenschafilichen Erforschung des Balatonsees.* Hölzel, Wien. **2**/1, 1—64.

5. HORTOBÁGYI, T. (1939) A Tisza »Nagyfa«-holtágának phytoplaktonja qualitativ vizsgálata. Qualitative Untersuchungen des Phytoplanktons des toten Armes »Nagyfa« der Theiss. *Folia Cryptogamica*, **3**, 151—216. (Ungarische Zusammenfassung, deutsch.)

6. HORTOBÁGYI, T. (1941) Algarendellenességek. Algenteratologien. *Bot. Közl.*, **38**, 79—86. (Ungarisch.)

7. HORTOBÁGYI, T. (1943) Adatok a Balaton boglári sestonjában, psammonjában és lasionjában élő moszatok ismeretéhez. Beiträge zur Kenntnis der im Boglárer Seston, Psammon und Lasion lebenden Algen des Balaton-Sees. *Magyar Biol. Kut. Munk.*, **15**, 75—127. (Ungarisch, deutsche Zusammenfassung.)

8. HORTOBÁGYI, T. (1945) *Pediastrum*-rendellenességek a Balatonból. Abnormitates generis *Pediastrum* e lacu Balaton (Hungaria). *Bot. Közl.*, **42**, 10—13. (Ungarisch).

9. HORTOBÁGYI, T. (1947) Néhány balatoni algára vonatkozó újabb megfigyelések. New observations on some algae from the lake Balaton. *Bot. Közl.*, **44**, 39—54. (Ungarisch, englische Zusammenfassung.)

10. HORTOBÁGYI, T. (1950) Biocoenotikai tanulmányok a Balaton somogyi nyíltvizén, tekintettel a halak táplálkozására. Biozönotische Untersuchungen auf der Südseite des offenen Wassers des Balaton, mit Rücksicht auf die Ernährung der Fische. *Annal. Biol. Univ. Budapest*, **1**, 198—299. (Ungarisch, russische Zusammenfassung.)

СЛУЧАИ ТЕРАТОЛОГИИ ВОДОРОСЛЕЙ ИЗ СЕСТОНА ОЗ. БАЛАТОН И ИХ ЗНАЧЕНИЕ В ИСТОРИИ РАЗВИТИЯ

Автором были найдены случаи тератологии на 14 из 402 разных организмов (то есть на 3,5% всех организмов), обнаруженных при обработке сборов сестона, проведенных в Балатонбогларе в открытой воде с песчаным дном в течение 1942—1943 гг.

Больше всего уродств обнаружено в роде Pediastrum, причем на первом месте стоит вид P. simplex несмотря на то, что этот вид и не является чаще всего встречающимся видом Pediastrum озера Балатон. Каждый пятый экземпляр сестона открытой воды и каждый третий-четвертый экземпляр набережного сестона проявляет какую-нибудь аномалию, причем ценобии с меньшим числом клеток автором не были рассмотрены как аномалии. Автор зачисляет аномалии видов Pediastrum в 9 типов. Половина случаев тератологии были ценобиями с 16 клетками, почти одна треть — ценобиями из 8 клеток, а одна пятая часть представляла собой ценобии из 32 клеток.

Аномалии вида *Crucigenia quadrata* var. *octogona* f. *pulchra* проявлялись в выпуклостях наружной части клеток. Аномалии вида *Scenedesmus* можно зачислить в 4 типа. Количество шипов вида *Tetrastrum staurogeniaeforme* меньше, и они изогнутые. В одной ценобии вида *Gloeoactinium limneticum* формы клеток уродливые. У вида *Staurastrum gracile* один из отростков отсутствовал. У вида *Lyngbya limnetica* витки неправильные.

Все аномалии обнаруживались — за исключением двух случаев — у порядка *Chlorococcales*, являющегося во всех месяцах порядком с наибольшим числом видов, и к которому относятся самые изменчивые роды озера Балатон. Изменчивость видов *Chlorophycea* говорит за то, что они являются более молодыми образованиями и обладают большей способностью приспособления чем роды *Cyanophyceae*, *Euglenophyceae*, *Chrysophyceae* и *Dinophyceae*. Большое число особей не связано с повышением числа аномалий, и даже не с их встречаемостью вообще. Водоросли с аномалиями не являются господствующими растениями с большим числом индивидуумов оз. Балатон. Бросается в глаза, что у растений, которые преобладают в количественном отношении, автором не было обнаружено уродств *(Gomphosphaeria lacustris*, *Ceratium hirundinella*, *Phacotus lenticularis)*.

LES ALGUES TÉRATOLOGIQUES DANS LE SESTON DU LAC BALATON ET LEUR IMPORTANCE DU POINT DE VUE DE L'ÉVOLUTION

Parmi les 402 organismes rencontrés au cours de l'élaboration des collections de seston recueillies dans l'eau à fond sableux, au large de Balatonboglár, en 1942—43, nous avons observé 14 espèces tératologiques, c'est à dire 3,5 p. cent des organismes.

Le plus grand nombre de formes anormales se trouve chez le genre *Pediastrum*, surtout chez *P. simplex*, bien que cette espèce ne soit pas la plus répandue dans le Lac Balaton. Dans le seston de l'eau du large un examplaire sur cinq, et dans celui du port un examplaire sur trois ou quatre présentent une anomalie quelconque, bien qu'on n'ait pas enregistré les cénobes à nombre réduit de cellules comme anomalies. Les anomalies de *Pediastrum* furent classées en 8 types. La moitié des formes tératologiques consiste en cénobes à 16 cellules, presque un tiers, en cénobes à 8 cellules et un cinquième en cénobes à 32 cellules.

Les anomalies de *Crucigenia quadrata* var. *octogona* f. *pulchra* se manifestent sous la forme de protubérances de la partie extérieure des cellules. Les anomalies de *Scenedesmus* peuvent être classées en 4 types. Les épines de *Tetrastrum staurogeniaeforme* sont de nombre plus réduit, et elles sont recourbées. Dans une colonie de *Gloeoactinium limneticum* les cellules étaient anormales. Chez *Staurastrum gracile* un des procès manque. Les spires de *Lyngbia limnetica* étaient irrégulières.

Les anomalies — à l'exception de deux — se sont rencontrées dans l'ordre des *Chlorococcales*. Pendant tous les mois de l'année cet ordre a le plus grand nombre d'espèces et les genres les plus variables du Lac Balaton. Cette variabilité des *Chlorophycées* semble prouver que leur formation est de date plus récente et que leur pouvoir d'adaptation est plus grand que celui des *Cyanophycées*, des *Euglenophycées*, des *Chrysophycées* et des *Dinophycées*.

Le grand nombre d'individus n'implique pas un plus grand nombre d'anomalies, ni même leur occurrence. Les algues qui présentent des anomalies n'appartiennent même pas aux plantes du Balaton possédant le plus grand nombre d'individus. Il est curieux, que chez les plantes qui dominent quantitativement nous n'avons pas observé d'anomalies *(Gomphosphaeria lacustris*, *Ceratium hirundinella*, *Phacotus lenticularis* etc.).

TIBOR HORTOBÁGYI, Eger, Szabadság-tér 2., Ungarn.

ZUM PROBLEM DER KREUZUNG VON NERVENBAHNEN

J. SZENTÁGOTHAI und GY. SZÉKELY

INSTITUT FÜR ANATOMIE, HISTOLOGIE UND EMBRYOLOGIE DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, PÉCS
(VORSTAND: J. SZENTÁGOTHAI)

(Eingegangen am 31. März 1955)

Zusammenfassung

An Hand einer Reihe teils neurohistologischer, teils experimenteller Beobachtungen werden die möglichen Ursachen der Kreuzung von nervösen Leitungsbahnen analysiert. Es wird als wahrscheinlich angenommen, dass folgende Faktoren eine wichtige Rolle spielen: 1. Eine geregelte Achsenorientation der Neuroblasten und die Tendenz der auswachsenden Nervenfortsätze, die durch die Achsenorientation festgelegte Richtung eine Strecke beizubehalten. 2. Aspezifische und spezifische Leitstrukturen, die die Wachstumsrichtung der über sie vordringenden Nervenfortsätze bestimmen. 3. Den sich kreuzenden Systemen innewohnende »individuelle« Tendenzen, trotz abnormer Umgebung ihren charakteristischen Verlauf innezuhalten.

Problemstellung

Wohl jeder, der sich mit dem Bau und der Funktion des Nervensystems befasste, hat sich seine Gedanken über die Bedeutung der Kreuzung von Nervenbahnen gemacht. Dass die beiden Hälften des Zentralnervensystems miteinander innigst verbunden sein müssen, d. h. also die biologische Notwendigkeit kommissuraler Systeme, ist ohne weiteres einzusehen. Weniger klar ist die biologische Bedeutung der Kreuzung projektiver Systeme und zwar sowohl bei auf- als auch bei absteigenden Bahnen. Interessanterweise ist dieses Problem meist von seiner teleologischen Seite angegriffen worden und die geistreichen Ausführungen von CAJAL [4] über die Opticuskreuzung sind trotz einiger Unstimmigkeiten, die sich aus der heute besser gekannten Projektion verschiedener Retinabezirke auf die primäre Sehrinde ergeben, sehr lesenswert und geben uns ein gutes Bild von der biologischen Ökonomie der Konstruktion des Nervensystems. Der Frage nach der Zweckmässigkeit einer Struktur oder Anordung wollen wir die wissenschaftliche Bedeutung nicht abstreiten, es ist dies jedoch in den meisten Fällen nicht der beste Weg ein so kompliziertes Problem in Angriff zu nehmen. Die andere und weniger verfängliche Seite von der so eine Frage angenähert werden kann, ist eine durch Zweckmässigkeitsvorstellungen unbeeinflusste Analyse jener Faktoren, die bei der Ausbildung von Nervenbahnkreuzungen eine Rolle spielen dürften. In vorliegender Arbeit unternehmen wir den Versuch, an einer Reihe von Beispielen — im Rahmen unserer heutigen Kentnisse über die richtunggebenden Faktoren des Nervenwachstums — auf

einige Momente hinzuweisen, die bei der ontogenetischen Ausbildung von Bahnkreuzungen in Betracht kommen.

Das Problem der Kreuzungen von Nervenbahnen ist ein wesentlich vielseitigeres, als es aus der Betrachtung der eklatanten Kreuzungen hervorgeht, wie Opticuskreuzung, Pyramidenkreuzung, Trochleariswurzelkreuzung usw. Wir glauben, dass das Verständnis für diese Frage wesentlich gefördert wird, wenn man neben diesen Bahnkreuzungen in erster Linie auch jene „Elementarkreuzungen" — so wollen wir diese Erscheinung nennen — analysiert, die sich ungemein häufig bei der Projektion peripherischer Innervationsgebiete in den primären Zentren zeigen. Beispiele für die „umgekehrte Projektion" peripherischer Innervationsgebiete sind sehr zahlreich, wobei freilich die Umkehrungsachse in verschiedenen Gebieten recht verschieden liegen mag. Ein allgemein bekanntes Beispiel ist die Projektion des Muskelsegments auf das Vorderhorn des Rückenmarks, bei der eine Kreuzung der Fasern eigentlich in doppeltem Sinne angenommen werden muss, und zwar einer zwischen den für den ventralen und dorsalen Ast bestimmten und einer zwischen den für Extensoren und Flexoren bestimmten Faserngruppen. Diese letztere Kreuzung ist allerdings nicht ganz klargelegt. Dasselbe Prinzip gilt auch für die umgekehrte Projektion des Dermatoms auf die *Substantia gelatinosa Rolandi* [17]. Bei einigen motorischen Hirnnervenkernen, besonders Nucleus facialis und trigemini, gibt es eine sehr deutliche umgekehrte dorsoventrale Projektion [15, 16]. Gut bekannt ist die BREGMANsche umgekehrte Lokalisation der drei Trigeminusäste in der Radix spinalis, der auch eine umgekehrte Projektion der durch die Äste versorgten Hautgebiete im Nucleus tractus spinalis nervi trigemini entspricht [2, 17]. Allgemein bekannt ist auch die umgekehrte Projektion der Retina (auch abgesehen von der Sehnervenkreuzung) auf das Tectum opticum bei niederen Vertebraten [13], dessen Prinzip auch für die Projektion auf die vorderen Vierhügel bei Säugern erhalten ist [3].

Wir wollen keineswegs behaupten, dass diesem allgemeinen Kreuzungsprinzip der Projektion peripherischer Versorgungsgebiete in den Zentren stets die gleichen Ursachen zugrundliegen, glauben aber, dass eine nähere Untersuchung dieser „Elementarkreuzungen" einige Momente klarer beleuchtet, die beim Problem der Nervenbahnkreuzung im allgemeinen in Betracht gezogen werden müssen.

Die »primäre« Achsenorientation der Neuroblasten und das geradlinige Wachstum der Nervenfasern

Zahlreiche Erfahrungen besonders der Gewebszüchtung zeigen, dass in unorientiertem (z. B. flüssigem) Medium die Nervenfasern eine anfangs angenommene Wachstumsrichtung geradlinig solange beibehalten, bis sie nicht durch irgendwelche Kräfte von dieser Richtung abgedrängt werden. Anderer-

seits wissen wir, dass bei einer bestimmten Gruppe von Neuroblasten der Nervenfortsatz nicht wahllos entspringt, sondern stets ziemlich genau orientiert in einer bestimmten Richtung hervorwächst. Die Neuroblasten zeigen also bezüglich des Auswachsens ihrer Nervenfortsätze eine ziemlich regelmässige Achsenorientation. Diese beiden Momente müssen, wenn auch vielleicht nur für kurze Strecken, die Wachstumsrichtung der auswachsenden Nervenfortsätze bestimmen. Wir wollen nun an einigen Beispielen der Frage nachgehen, ob im Organismus selbst solche Faktoren überhaupt eine Rolle spielen dürften.

Die BREGMANsche *Lokalisation der Trigeminusäste im Tractus spinalis nervi trigemini :* Ohne auf diese Seite des Problems einzugehen, wird von ANGULO [1] die Achsenorientation von spindelförmigen Neuroblasten im Trigeminusganglion von Rattenfeten zwischen 2—6 mm Länge dargestellt. Die den Ramus ophtalmicus bildenden Neuronen, in einem dorsal über die Augenblase nach oral gerichteten Fortsatz der Ganglienanlage, sind mit ihren Achsen mit diesem Fortsatz parallel orientiert, die zum Ramus mandibularis gehörenden Neuronen liegen mit ihren Achsen in nahezu rechtem Winkel zu den ersteren und parallel zu einem hinter der Augenblase in ventraler Richtung orientiertem Fortsatz. Die Maxillarisneuronen bilden mit beiden ersteren je einen Winkel von annähernd 45°. Denkt man sich die aus den hinteren Polen der Neuroblasten ihren Achsen gemäss gerichteten zentralen Fortsätze gegen das Metencephalon verlängert, so müssen sich die Fortsätze beim Eintritt in den Hirnstamm überkreuzen und die zentralen Fortsätze der Ophtalmicusneuronen ventral, und die der Mandibularisneuronen dorsal zu liegen kommen. Dies entspricht den als BREGMANsche Lokalisation bekannten tatsächlichen Verhältnissen vollkommen (Abb. 1a).

Die gekreuzte Projektion des Dermatoms in der Substantia gelatinosa Rolandi. Besonders deutlich sieht man diese Verhältnisse bei Eidechsenembryonen, aber auch bei Hühnerembryonen sind sie zu erkennen. In dem Spinalganglion liegen die Achsen der bipolaren Neuroblasten, die zu dem Ramus ventralis gehören, annähernd in einer paramedianen Sagittalebene, wogegen jene der Ramus-dorsalis-Neuronen nahezu einen rechten Winkel zu den ersteren bilden. Verfolgt man die zentralen Fortsätze dieser Neuronen, so lässt sich ihre Überkreuzung in der Dorsalwurzel deutlich beobachten (Abb. 1b—f). Das Ergebnis dieser Überkreuzung ist, dass die zentralen Fortsätze der Ramus-dorsalis-Neuronen ventral von jenen der Ramus-ventralis-Neuronen in das Hinterhorn eintreten. Dies ist also im Prinzip dasselbe wie bei der BREGMANschen Lokalisation der zentralen Trigeminuszweige. Zieht man nun die infolge Ausbildung des Hinterstranges zustandekommende Einbiegung der dorsalen Kante des Hinterhornes nach medial in Betracht, so stimmt dieser Entwicklungsgang vollkommen mit dem Umstand überein, dass der zum Ramus dorsalis gehörende Teil des Dermatoms in den lateralen, der zum Ramus ventralis gehörende in den medialen Teil der Substantia gelatinosa projiziert ist [17].

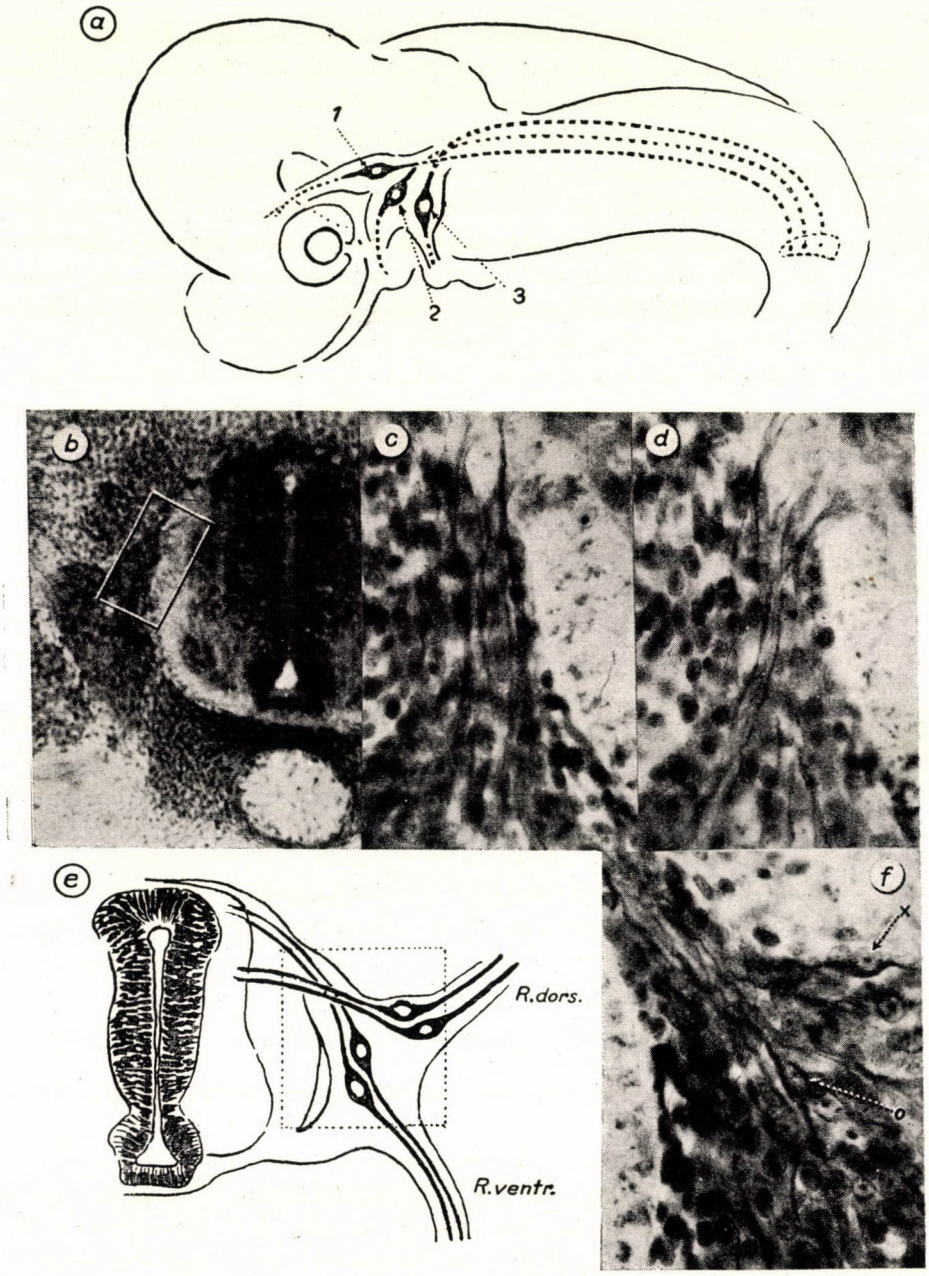


Abb. 1. a) Zustandekommen der BREGMANschen Lokalisation in der Radix spinalis durch Überkreuzung der zentralen Fortsätze der Neuronen des Ganglion trigemini. Achsenorientation der 1. Ophthalmicusneuronen, 2. Maxillarisneuronen, 3. Mandibularisneuronen nach Angaben von ANGULO[1].—b) Querschnitt eines Eidechsenembryos *(Lacerta viridis)* von 2 Wochen, Rückenmark und Spinalganglionanlage. Imprägnation nach Bodian. — c) Rechteckiger Ausschnitt aus b) mit stärkerer Vergrösserung. Zentrale Fortsätze der zum *Ramus ventralis* gehörenden Neuronen. —d) Derselbe Ausschnitt mit etwas anderer Feineinstellung, die zentralen Fortsätze der zu dem *Ra-*

Kreuzung der Opticusfasern hinter der Linse bei Zyklopoiden. Die Bedeutung der primären Achsenorientation der Neuroblasten für die Wachstumsrichtung der Nervenfortsätze zeigt sich besonders deutlich bei der Entwicklung des Nervus opticus in spaltlosen Augen. Spaltlose Augenanlagen erhält man in einem schönen Prozentsatz bei Zyklopoiden von Urodelen. In mehreren Versuchsserien wurde bei *Triturus taeniatus* im Medullarplattenstadium (St. 15) nach MANGOLD [7] das dem vorderen Teil der Medullarplatte unterliegende Mesoderm entfernt. Unter zahlreichen mehr oder minder inkompletten Fusionen der Augenanlage fanden sich einige (4 einwandfreie Fälle) komplette spaltlose Zyklopen (Abb. 2a).

An nach BODIAN impraegnierten Praeparaten ist mit vollkommener Deutlichkeit zu beobachten, dass sich die aus den beiden Hälften der Ganglienzellschichte hervortretenden und medialwärts verlaufenden Opticusfasern hinter der Linse vollkommen kreuzen und je einen Nervus opticus bilden, die unter einem Winkel von etwa 90° divergierend ohne jeden sichtbaren praeformierten Spalt die Retinaanlage durchbohren und in den seitlich-hinteren Quadranten des Auges im Pigmentepithel stecken bleiben (Abb. 2b—e). Diese Beobachtung illustriert einesteils die bekannte Tatsache, dass ohne Augenspalt und Augenbecherstiel der Nervus opticus nicht aus der Augenanlage austreten kann, anderenteils aber auch, dass in Ermangelung eines Augenspalts die von jeder Hälfte der zyklopoiden Retina sich sammelnden Opticusfasern ihren ursprünglichen nach medial und hinten gerichteten Verlauf über die Mittellinie hinaus beibehalten und nach kompletter Kreuzung mit den Fasern der gegenüberliegenden Retinahälfte ihre ursprüngliche Verlaufsrichtung (nun nach lateral und hinten) fortsetzen. Da von einem in dieser Richtung vorhandenen Augenspalt keine Rede sein kann, zeigt dies, dass in Ermangelung der *Hauptleitstruktur* des Nervus opticus die Nervenfasern ihren Weg ihrer ursprünglichen Achsenorientation entsprechend in einer Richtung und durch Strukturen fortsetzen, wo sie unter normalen Bedingungen niemals hingelangen.

Bestimmung der Wachstumsrichtung der Nervenfortsätze durch »Leitstrukturen«

Durch die geistreichen Versuchsanordnungen von WEISS [19] besonders im Gebiete der Gewebszüchtung, ist die richtungbestimmende Rolle der mizellaren Ultrastruktur des Mediums für das Wachstum der Nervenfasern klar dargetan. Hiezu gesellen sich zahlreiche Beobachtungen über embryonales Wachstum und Regeneration von Nervenfasern, bei denen die Rolle von mizel-

mus dorsalis gehörenden Neuronen kreuzen sich mit den ersteren und treten mehr ventral in das Rückenmark ein. — e) Lage des auf f) dargestellten Ausschnitts aus einem anderen Segment, wo die Orientation der Achsen der zu dem *Ramus dorsalis* (x) und zu dem *Ramus ventralis* (o) gehörenden Neuronen sichtbar ist.

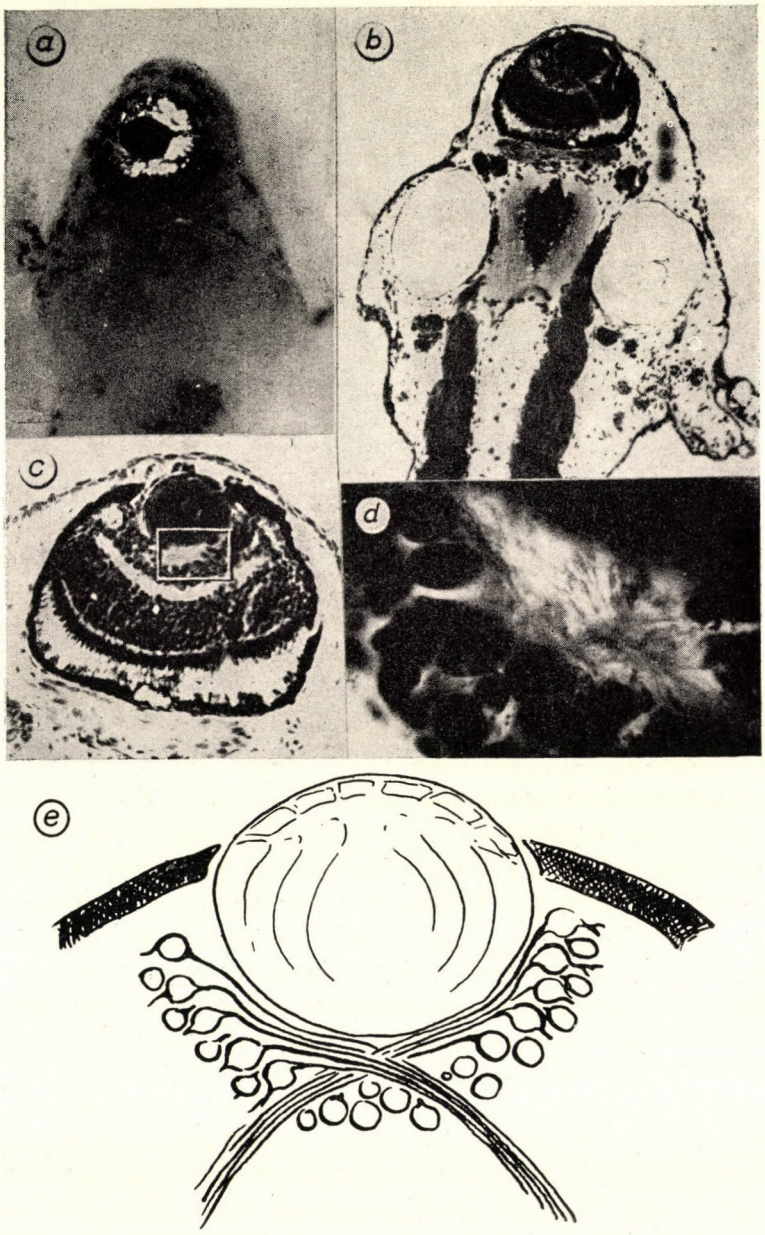


Abb. 2. Zyklops von *Triturus taeniatus.* a) Ventralansicht, b) Längsschnitt, der aus der linken Retinahälfte entspringende, hinter der Linse gekreuzte N. opticus, ist rechts sichtbar, der andere liegt in einer etwas anderen Ebene. — c) Gibt die Lage des Ausschnitts an, der in d) bei stärkerer Vergrösserung die Kreuzung der Opticusfasern hinter der Linse zeigt. — e) Schematische Darstellung der Verhältnisse

laren, oder gröberen Strukturen (Bindgewebfasern, Zelloberflächen usw.) als Leitformation auswachsender Nervenfasern angenommen werden muss. Dass solche mizellare Orientationen des Grundmediums bei den Kreuzungen der Fasersysteme eine bedeutende Rolle spielen, ist recht wahrscheinlich. WEISS [20] erwähnt hierfür ein schönes Beispiel beim Medullarrohr. Es ist festgestellt [6], dass die sagittale spaltförmige Gestalt des Zentralkanals an die Gegenwart der Chorda dorsalis gebunden ist. Nach WEISS beruht dies darauf, dass die Mittellinie der Medullarplatte mittels eines Fasersystems in die Chorda verankert ist. Beim Schluss des Medullarrohres werden die beiden Seitenflächen über diesem Scharnier wie die Deckel eines Buches geschlossen. Dies muss im Ventralteil des Medullarrohres zu starken transversalen Spannungen und dadurch zu einer entsprechenden ultrastrukturellen Organisation des Mediums führen, welche wohl zum Teil für die Faserkreuzungen in der vorderen Kommissur verantwortlich sein dürften. — Allerdings stecken solche Vorstellungen noch in ihren »grob mechanistischen« Anfängen und im Gesamtorganismus werden die Nervenfasern nicht durch so einfache allgemein-mechanische Momente, sondern wahrscheinlicher durch ein kompliziertes System teils aspezifischer, teils spezifischer Leitelemente und Leitstrukturen fortgeleitet. Diese müssen, nachdem die Ergebnisse der Gewebszüchtung auf einige allgemeine Faktoren hingewiesen haben, für jeden Spezialfall gesondert analysiert werden. Für die Rolle spezifischer Leitstrukturen findet man bei der Analyse des Wachstums des Nervus opticus bei Zyklopoiden zahlreiche Hinweise.

Opticuskreuzung bei inkompletten Zyklopoiden. Die wachstumsrichtungsbestimmende Rolle des Augenspaltes und des Augenstiels für die Opticusfasern ist bekannt [10]. Es ist auch bekannt [9], dass bei zyklopoiden Bildungen mit vorhandenem Augenspalt der Nervus opticus sich immer in dem Augenspalt ausbildet. Wir suchten unsere Zyklopoiden von Triturus taeniatus in Hinsicht eventueller die Kreuzung der Opticusfasern bestimmender Faktoren auszuwerten. In dieser Beziehung sind zwei Missbildungsformen interessant.

In die erste Gruppe können wir 5 Tiere mit inkompletter Fusion der Augenanlage und zwei Linsen rechnen. Gemeinsam für diese Gruppe ist die den beiden Augenspalten entsprechend erfolgte ventro-mediane Vereinigung der Augenanlagen. Die Nervi optici treffen in allen 5 Fällen im vereinigten Retinagebiet zusammen (Abb. 3a—d). Die Bündel kreuzen sich deutlich, überschneiden sich aber — im Gegensatz zu den im vorherigen Abschnitt erwähnten Fällen (ohne Augenspalt) — nicht, sondern ziehen gemeinsam in der Mittellinie der Augenanlage in dorsaler Richtung. Das gemeinsame Bündel tritt durch eine Öffnung des Pigmentepithels durch und erreicht die ventrale Kante des Zwischenhirnes ziemlich genau in der Mittellinie. Es ist schwer den Verlauf aller Faserbündel genau zu beobachten, soweit aber solche einwandfrei verfolgt werden konnten, treten sie deutlich in die ihrem Ursprung entgegengesetzte Seite des Zwischenhirnes ein. Man könnte sich dies schwerlich als Zufall vorstellen. Ähnlicher Ver-

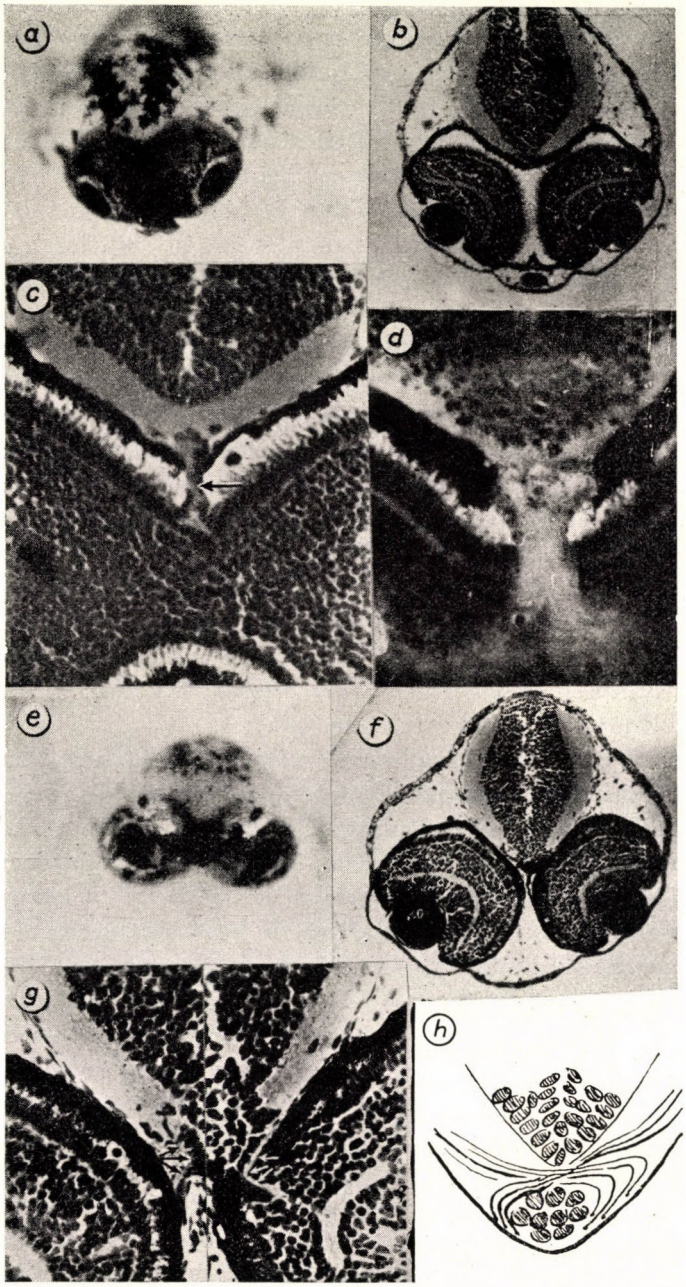


Abb. 3. a) Unvollständiger Zyklops von *Triturus taeniatus* in Vorderansicht, bei dem dorsal b) nur die Pigmentepithelschicht, ventral c) auch die Retinaanlage vereinigt ist. An der bezeichneten Stelle sieht man den medianen, von Augenbecherstielzellen umgebenen N. opticus. — d) Ein anderer ähnlicher Fall, mit deutlicher Kreuzung der Opticusbündel. — e) Vorderansicht einer zyklopoiden Missbildung von *Triturus taeniatus* ohne Fusion, aber Dorsalposition der

lauf der Nervenfasern ist auch bei menschlichen Zyklopoiden beschrieben worden mit dem Unterschied, dass es sich bei diesen um verhältnismässig lange Nervi optici handelt, wogegen bei unseren Trituruszyklopen eigentlich kein Nervus opticus ausserhalb der Augenanlage existiert. Interessanterweise finden sich aber innerhalb der durch das Pigmentepithel eingeschlossenen Augenanlage eben solche pigmenttragende Zellen wie normalerweise im Augenstiel, die den schon gekreuzten gemeinsamen Nervus opticus innerhalb der Augenanlage ebenso umsäumen, wie normalerweise den Nervus opticus ausserhalb der Augenanlage.

Ist solch ein innerhalb der Augenanlage liegender Zellstiel nicht vorhanden, so laufen die beiden Nervi optici ineinander und bilden entweder neuroartige Knäuel, oder ziehen einfach bis zu ihrem gegenseitigen Ursprungsgebiet weiter, wo sie sich verlieren (3 Fälle).

Aus diesen Beobachtungen geht klar hervor, dass die Ausbildung eines Nervus opticus an die Existenz von speziellen Zellen gebunden ist, die normalerweise den Augenstiel bilden, die aber auch in teilweise vereinigte Augenanlagen eindringend innerhalb der Anlage gekreuzte Opticusfasern an ihren Bestimmungsort leiten können. Das Eigentümliche dabei ist, dass trotz Kreuzung der Opticusfasern in verschiedener Tiefe der Augenanlage und trotz sehr verschieden langem Verlauf von der Kreuzung bis zur ventralen Kante des Diencephalons alle sicher verfolgbaren Bündel in die ihrem Ursprung entgegengesetzte Seite des Diencephalons gelangen.

In einer Anzahl unserer Beobachtungen waren die Befunde ähnlich wie die von ROGERS [9]. Eintritt beider Nervi optici auf die eine Seite. Es handelte sich dabei aber um stark unregelmässige und asymmetrische Bildungen — wie im übrigen auch bei ROGERS — aus denen sich unseres Erachtens keine Schlüsse ziehen lassen. Die von uns verwerteten Fälle sind ausschliesslich solche mit vollkommen symmetrischen Augen- und Hirnbildungen.

Zur zweiten Gruppe rechnen wir Missbildungen mit zu starker Dorsalposition der Augenanlagen im Verhältnis zur Ventralkante des Diencephalons (2 Fälle). In beiden Fällen richtete sich der Augenstiel nicht tangential auf die Ventralseite des Zwischenhirns, sondern eher senkrecht auf dessen Seitenflächen. Die Folge davon ist im einen Falle eine nur teilweise Kreuzung der Nervenfasern und Abbiegen des grösseren Teils der Fasern ins Diencephalon der eigenen Seite. Im anderen Falle (Abb. 3e—h), bei dem die Ventralkante des Diencephalons abnorm zellreich ist, biegen beide Nervi optici auf der eigenen Seite nach dorsal um. Interessanterweise setzen aber die Fasern ihren nach dorsocaudal gerichteten Verlauf nur solange fort, bis die abnorm ventral liegende Zellgruppe

---

Augenanlagen, f) Frontalschnitt, in g) sieht man an den mit Pfeilen bezeichneten Stellen den Eintrtt der N. optici auf die eigene Seite. — h) Nachdem etwas caudalwärts die ventrale Zellgruppe aufhört, kreuzen sich die Opticusfasern an abnormer Stelle

anhält. Sobald sie einige Schnitte weiter caudal aufhört, biegen die Faserbündel des Tractus opticus scharf nach medial um (Abb. 3h) und kreuzen sich wesentlich caudal und dorsal von ihrer normalen Kreuzungsstelle und gelangen in ihrem weiteren Verlauf zu ihrem normalen Endigungsort im gegenseitigen Tectum. Dieser Fall ist insofern interessant, als sich hier beide Tractus optici nach abnormem Eintritt in die eigene Seite des Zwischenhirns, aber nach einer, vom Fehlen der Kreuzung abgesehen, angenommen normalen Verlaufsrichtung im Zwischenhirn ohne sichtbaren Grund — d. h. allerdings nach Wegfall des Hindernisses, das sie an der Kreuzung an normaler Stelle hinderte — scharf umbiegend, an abnormem Orte nachträglich kreuzen.

Diese Beobachtungen deuten dahin, dass durch die in den pigmenthaltigen Augenstielzellen gegebene Leitstruktur der Verlauf des Nervus opticus normalerweise ausserhalb der Augenanlage (bei zyklopoiden Bildungen auch innerhalb derselben) festgelegt ist, und dadurch besonders im Normalfalle die Bedingungen für eine totale Kreuzung des Nervus opticus weitgehend gesichert sind, da die Opticusfasern genau tangential an die Ventralfläche des Diencephalons herangeführt werden. Bei zyklopoiden Missbildungen sind die Augenstielzellen scheinbar unerlässlich für die Herausführung der innerhalb der Augenanlage gekreuzten Opticusfasern. In diesen Fällen ist es aber unverständlich, wie die einen medianen innerhalb der Augenanlage liegenden Augenstiel bildenden Leitstrukturen die vorwiegende gekreuzte Verbindung zwischen Retinahälfte und Diencephalon sichern. Vollends jene Beobachtung aber, die eine nachträgliche Kreuzung von Opticusfasern nach Eintritt in die eigene Diencephalonseite zeigt, deutet darauf, dass bei der Kreuzung der Opticusfasern ein Faktor eine Rolle spielen muss, der mit der ursprünglichen Richtung des Wachstums und mit Leitstrukturen nicht im Zusammenhange stehen kann, sondern als den Opticusneuronen spezifische »innere Gegebenheit« betrachtet werden muss. Solche, den Neuronen innewohnende, spezifische Eigenschaften mussten zur Erklärung des Verhaltens ihrer Ausläufer nach Achsendrehungen und sonstigen Transplantationen ihres Stammgebietes auch von anderen Autoren angenommen werden [8].

Die Frage nach einer »Seitenspezifität« der Neuronen

Das überaus interessante neue Tatsachenmaterial, das — ausgehend von frühen Beobachtungen von WEISS [18] — über die Spezifität der Neuronen vor allem durch SPERRY [11] und STONE [12] zutage gefördert wurde, lässt den Gedanken aufkommen, ob bei der Kreuzung gewisser Fasersysteme nicht eine »Seitenspezifität« der Neuronen eine Rolle spielt. Diese könnte man sich im Sinne einer gewissen Affinität der Ausläufer gewisser Neuronen für irgendeine spezifische Eigenschaft der Hirnanlage der entgegengesetzten Seite vorstellen. Gewisse zeitliche Unterschiede bei der Differentiation von Gewebselementen der

beiden Körperhälften wurden schon beobachtet [5], so dass die Annahme eines Unterschiedes, wenn auch nur eines zeitlichen, durchaus nicht unmöglich ist. Aus den Untersuchungen von SPERRY [11] geht hervor, dass durch geeignete Eingriffe der Nervus opticus von Anuren mit dem gleichseitigen Tractus opticus verbunden werden kann und dadurch seitenvertauschte Gesichtsfelder geschaffen werden können. In unserem zahlreichen Material seitenvertauschter Transplantationen der Augenanlage bei *Triturus taeniatus* in praefunktionellen Stadien, beobachteten wir einige Fälle, bei denen teils vom transplantierten (2 Fälle), teils vom normalen Auge (4 Fälle) bei Ausbildung der Larven auf seitenvertauschte Gesichtsfelder hindeutende Reflexe ausgelöst werden konnten. Histologische Prüfung zeigte in allen solchen Fällen das Einwachsen des Nervus opticus in die eigene Seite des Tectum opticum. Der Umstand, dass vom seitenvertauscht eingesetzten Auge ein Einwachsen der Opticusfasern auf die eigene (also ursprünglich entgegensetzte) Seite nicht häufiger eintritt als beim normalen Auge, zeigt deutlich, dass irgendeine »Affinität« der z. B. rechtseitigen Retinaneuronen für die linke Hirnhälfte nicht existiert. Das die dem normalen Auge entspringenden Opticusfasern häufiger ungekreuzt bleiben, erklärt sich leicht dadurch, dass Störungen der Hirnbildung auf der Seite der Transplantation verhältnismässig häufig die Kreuzung der Opticusfasern von der normalen Seite verhindern. Nach frühembryonaler Transplantation von Retinaanlagen treten Opticusneuronen im Tectum opticum ohne Rücksicht auf ihre Seitenzugehörigkeit, dem Spezifitätgesetz von SPERRY gemäss, stets nur mit den ihnen »herkunftsgemäss« entsprechenden Tectumneuronen in funktionellen Zusammenhang; d. h. ursprünglich nasale Retinaneuronen können — einerlei ob auf der eigenen oder der Gegenseite — nur mit caudalen Tectumneuronen und ursprünglich temporale Retinaneuronen nur mit oraleren Tectumneuronen in synaptischen Zusammenhang treten [14]. — Aus diesen Beobachtungen geht mit unmissverständlicher Deutlichkeit hervor, dass es wenigstens bei den Opticusneuronen keine Spur einer Seitenspezifität gibt. Die einander spiegelbildlich entsprechenden Opticusneuronen der beiden Seiten sind bezüglich funktioneller Spezifität identisch, haben aber, im Sinne der im vorhergehenden Abschnitt gesagten, einen »innewohnenden Hang« sich von der Seite, wo ihre Ursprungszellen liegen, auf die andere Seite zu kreuzen.

Schlussbetrachtungen

Auf Grund der ausgeführten Erwägungen kommen als Ursachen der Kreuzung nervöser Leitungsbahnen vorderhand folgende drei Faktoren in Betracht:

1. Primäre Achsenorientation der Neuroblasten und das geradlinige Wachstum der Nervenfortsätze.

2. Aspezifische oder spezifische Leitstrukturen in unmittelbarer Umgebung der auswachsenden Nervenfasern.

3. Den sich kreuzenden Systemen innewohnende »individuelle« Fähigkeit, trotz weitgehend abnormer Umgebung ihren charakteristischen Verlauf innezuhalten.

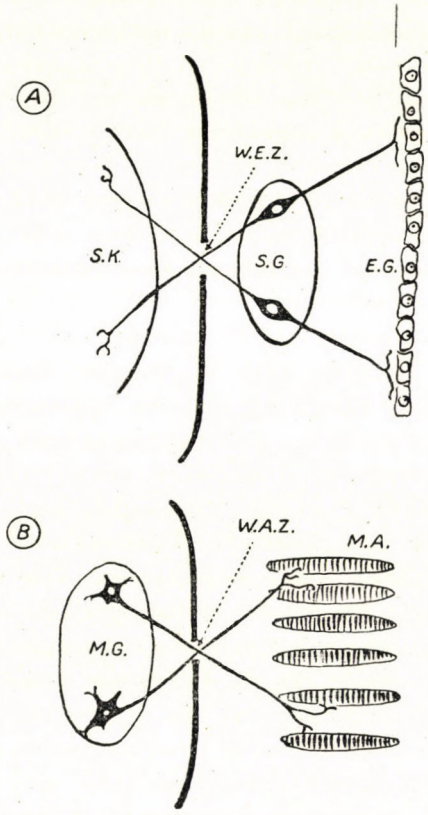


Abb. 4. Schematische Darstellung des »*Camera obscura*« *Prinzips* der Projektion peripherischer Innervationsgebiete in den primären Zentren. A. sensible, B. motorische Projektion. S. K. = sensibler Endkern, W. E. Z. = Wurzeleintrittszone, S. G. = sensibles Ganglion, E. G. = Endgebiet., M. G. = motorischer Kern, W. A. Z. = Wurzelaustrittszone, M. A. = Muskelanlage

Ad 1. Die geradlinige Wachstumtendenz und die primäre Achsenorientation der Neuroblasten dürften vor allem beim Entstehen der Projektion peripherischer Innervationsgebiete in den Zentren erster Ordnung eine Rolle spielen. Die meisten somatotopischen Lokalisationen verhalten sich, als ob die Projektion — besonders im Zeitpunkt ihrer Ausbildung — »mittels der Camera obscura hergestellt worden wäre«, wie wir dies grob schematisiert für eine motorische und sensible Projektion auf Abb. 4 darstellen. Dieser Darstellungsweise

entspricht weitgehend die Tatsache, dass der Aus- und Eintritt von Neuronen bei Zentralorganen an fest umrissene punkt- oder streifenförmige Bezirke (Ein- bzw. Austrittszonen der Wurzeln) gebunden ist, was in diesem Falle dem »Loch« der Lochkamera entsprechen würde. In dem einleitenden Absatz hatten wir Gelegenheit, auf die Existenz der zahlreichen »Elementarkreuzungen« oder gekreuzten Projektionen hinzuweisen. Als Strukturen, bei welchen ähnliche Momente eine Rolle spielen dürften, müssen wir hierzu noch die inneren Chiasmabildungen der Insekten- und Cephalopodenretina rechnen. Hierbei dürften aber auch Spannungen eine Bedeutung haben, wie sie von WEISS für das Gebiet zwischen zwei benachbarten kompakteren und eventuell im Wachstum begriffenen Gewebsmassen angenommen werden. — Wir müssen hervorheben, dass man sich diese Zusammenhänge freilich nicht grob mechanistisch denken darf, sondern viel eher als Bedingungen, die besonders in frühen Stadien der phylogenetischen Entwicklung zur Ausbildung dieser gekreuzten Projektionen beigetragen haben. In der Ontogenese wird man sich das Zustandekommen der gekreuzten Projektionen durch das Zusammenwirken zahlreicher Bedingungen und richtunggebender Faktoren vorstellen müssen. Immerhin zeigt unser Beispiel der Opticuskreuzung hinter der Linse bei spaltlosen Zyklopenaugen, dass die primäre Achsenorientation der Neuroblasten und die geradlinige Wachstumtendenz der Nervenfortsätze bei Gelegenheit weitgehend richtungsbestimmend sein können, wenn andere Faktoren (Augenspalt und Augenstiel) wegfallen.

Ad 2. Aspezifische und spezifische Leitstrukturen mögen bei den Kreuzungen allgemein eine bedeutende Rolle spielen. Das vorwiegende Auftreten von Kreuzungen an jenen Stellen der Hirnanlagen, die im Laufe der Entwicklung scharf umgebogen werden, wo man also mit transversalen Spannungen der Matrix rechnen muss, spricht für die Bedeutung wahrscheinlich aspezifischer Leitstrukturen durch Spannungsorientation der Mizellen. Spannungsorientationen könnten durch verschiedene andere Ursachen auch an vielen anderen Stellen des Medullarrohres (Biegungen, Flüssigkeitsdruck und Strömung im Zentralkanal usw.) entstehen. — Beim Nervus opticus ist die vorherrschende Bedeutung der Augenstielzellen offenbar. Sie bilden eine spezifische Leitstruktur, für die die Opticusfasern eine selektive Affinität besitzen. Bei der Durchsicht der Schnittserien von insgesamt 25 zyklopoiden Missbildungen konnten wir sehr oft unmittelbar in der Nähe des Augenstieles teils unregelmässig fortwachsende Nervenfasern der Hirnnerven, aber doch in keinem Falle eine Beimengung solcher Fasern zum Augenstiel beobachten. Dagegen konnten einwandfreie Opticusfasern ohne Augenstielelemente ausserhalb der Augenanlage und des Diencephalons nicht einmal für einige μ frei fortwachsen. Die Augenstielzellen bilden also eine weitgehend spezifische Leitstruktur für Opticusfasern, für die peripherische Nervenfasern keinerlei Affinität besitzen. Die Bedingungen für die normalerweise totale Kreuzung (bei niederen Wirbeltieren) sind durch die tangentiale Heranführung der Opticusfasern an die scharf gebogene Ventral-

fläche (Kante) des Diencephalons gegeben. Werden die Opticusfasern etwas mehr dorsal an die Seitenwände des Zwischenhirnes oder mit mehr ventrodorsaler Richtung herangeführt, so sind auch bei diesen Tieren die Bedingungen einer partiellen Kreuzung, ähnlich jener bei höheren Säugern, — oder des gleichseitigen Einwachsens gegeben.

Ad 3. Den sich kreuzenden Systemen innewohnende Tendenzen zur Kreuzung müssen wir jedoch auch annehmen. Trotz hochgradiger Abnormitäten — insbesondere bei gemeinsamem Augenstiel — kommt es zu einer deutlichen Kreuzung der Mehrzahl der Opticusfasern, obwohl hierbei die vorstehend erwähnten Momente fehlen und besonders auch die Umgebungsbedingungen grundlegend von den Normalverhältnissen abweichen. Die spätere Kreuzung schon auf die eigene Seite eingetretener und den normalen Weg zum Tectum opticum eingeschlagener Opticusfasern deutet in gleiche Richtung. Interessanterweise kommt PIATT [8] auf Grund von Umdrehungsexperimenten der dorsalen Zwischen-Mittelhirnanlage zum gleichen Ergebnis, ohne gleich uns irgendeine Erklärung für diese Beobachtung geben zu können. Eine funktionelle Seitenspezifität der Opticusneuronen im Sinne einer chemischen oder sonstigen Affinität zur gegenseitigen Hirnhälfte muss aber mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Aus diesen Ausführungen dürfte hervorgehen, dass die Frage der Kreuzung von Nervenbahnen auch ohne damit verbundene Zweckvorstellungen ein interessantes und grundlegendes Problem der Neurogenese ist, das mit den Methoden der experimentellen Embryologie angegriffen werden kann. Eine Behandlung dieses Problems in erster Annäherung erweckt keineswegs den Eindruck, dass Kreuzungen infolge einer inneren Notwendigkeit der »ökonomischen und zweckmässigen« Funktion entstehen; man ist eher geneigt anzunehmen, dass im bilateral symmetrischen Bauplan der Zentralorgane von Wirbeltieren und in den elementaren Wachstumsvorgängen der Nervenfortsätze liegende Gegebenheiten notwendigerweise zur Ausbildung von Nervenbahnkreuzungen führen müssen.

LITERATUR

1. ANGULO, A. W. (1951) A comparison of the growth and differentiation of the trigeminal ganglia with the cervical spinal ganglia in albino rat embryos. *J. Comp. Neur.*, **95**, 53—71.

2. BREGMAN, E. (1892) Über experimentelle aufsteigende Degeneration motorischer und sensibler Hirnnerven. *Jahrb. Psychiatr.*, **11**, 73—97.

3. BROUWER, B. (1927) Anatomical, phylogenetical and clinical studies on the central nervous system. Baltimore.

4. CAJAL, S. R. y (1899) Die Struktur des Chiasma opticum. Leipzig, Barth.

5. HARRISON, J. R. (1952) In vitro analysis of differentiation of retinae pigment in the developing chick embryo. *Anat. Rec.*, **113**, 557. (Abstract.)

6. HOLTFRETER, J. (1935) Formative Reize in der Embryonalentwicklung der Amphibien, dargestellt an Explantationsversuchen. *Arch. exp. Zellf.*, **15**, 281—301.

7. MANGOLD, O. (1931) Das Determinationsproblem. III. Das Wirbeltierauge in der Entwicklung und Regeneration. *Erg. Biol.*, **7**, 193—403.

8. PIATT, J. (1949) A study of the development of fiber tracts in the brain of *Amblystoma* after excision or inversion of the embryonic di-mesencephalic region. *J. Comp. Neur.*, **90**, 47—93.

9. ROGERS, K. T. (1952) Optic nerve pattern evidence for fusion of eye primordia in cyklopia in *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Zool.*, **120**, 287—309.

10. SATO, T. (1933) Über die Determination des fetalen Augenspaltes bei *Triton taeniatus*. *Roux' Arch.* **128**, 342—377.

11. SPERRY, R. W. (1951) Regenerative factors in the orderly growth of neural circuits. *Growth, Symp.*, **10**, 63—87.

12. STONE, L. S. (1953) Normal and reversed vision in transplanted eyes. *Arch. Ophthalm.*, **49**, 28—35.

13. STRÖER, W. F. H. (1940) Zur vergleichenden Anatomie des primären optischen Systems bei Wirbeltieren. *Z. Anat.*, **110**, 301—321.

14. SZÉKELY, GY. (1954) Zur Ausbildung der lokalen funktionellen Spezifität der Retina. *Acta Biol. Hung.*, **5**, 157—167.

15. SZENTÁGOTHAI, J. (1948) The representation of facial and scalp muscles in the facial nucleus. *J. Comp. Neur.*, **88**, 207—220.

16. SZENTÁGOTHAI, J. (1949) Functional representation in the motor trigeminal nucleus. *J. Comp. Neur.*, **90**, 111—120.

17. SZENTÁGOTHAI, J., KISS, T. (1949) Projection of dermatomes on the substantia gelatinosa. *Arch. Neurol. & Psychiatr.*, **62**, 734—744.

18. WEISS, P. (1924) Die Funktion transplantierter Amphibienextremitäten. Aufstellung einer Resonanztheorie der motorischen Nerventätigkeit auf Grund abgestimmter Endorgane. *Roux' Arch.*, **102**, 635—672.

19. WEISS, P. (1934) In vitro experiments on the factors determining the course of the outgrowing nerve fiber. *J. Exp. Zool.*, **68**, 393—448.

20. WEISS, P. (1950) Genetic neurology. University of Chicago Press, Chicago.

О ПРОБЛЕМЕ ПЕРЕКРЕЩИВАНИЯ НЕРВНЫХ ПУТЕЙ

Авторы анализируют на основании отчасти нейрогистологических, а отчасти экспериментальных наблюдений возможные причины перекрещивания нервных путей. По их мнению можно предполагать, что : 1. Нейробласты обладают осевой ориентацией, а нервные отростки проявляют стремление сохранять определенное осевой ориентацией направление еще в течение некоторого пути. 2. Неспецифические и специфические проводниковые структуры определяют направление роста проникающих через них нервных отростков. 3. В перекрещивающихся системах проявляются «индивидуальные» стремления сохранять свои характеристические направления, несмотря на ненормальную окружающую среду.

ON THE PROBLEM CONCERNING THE DECUSSATION OF NERVOUS PATHWAYS

The problem of the decussation of nervous pathways is discussed on the basis of neurohistological and experimental observations. Factors considered are : 1. regulated axial orientation of the neuroblasts and the tendency of the outgrowing nerve processes to retain the direction fixed by axial orientation ; 2. the role of aspecific and specific structures in determining the direction of growth of the nerve processes ; 3. an inherent tendency in the decussating systems to adhere to their characteristic course even in an abnormal environment.

JÁNOS SZENTÁGOTHAI, Pécs, Dischka Gy. u. 5, Ungarn
GYÖRGY SZÉKELY, Pécs, Dischka Gy. u. 5, Ungarn

DAS ENTSTEHEN VON ZELLEN AUS PLASMATEILCHEN PFLANZLICHER MIKROORGANISMEN

I. KISS

LEHRSTUHL FÜR BOTANIK DER PÄDAGOGISCHEN HOCHSCHULE, SZEGED (VORSTAND: I. KISS)

(Eingegangen am 22. April 1955)

Zusammenfassung

Der Verfasser machte bei mehreren pflanzlichen Mikroorganismen die Beobachtung, dass die Zellen unter ungünstigen Bedingungen in 1—2 μ grosse, grüne Körperchen, sog. Hyperfragmente zerfallen, die sich — ihre Lebensfähigkeit auch weiterhin bewahrend — zu Zellen entwickeln können. Der Autor beschäftigt sich eingehend mit den Körperchen der einzelligen *Chlamydomonas*-Pflanze. Während der Entwicklung der Hyperfragmente zur Zelle traten Veränderungen scheinbar bedeutenden Ausmasses ein. Die Zellen mit *Chlamydomonas*-Charakter verwandelten sich im Laufe der sog. Vertiefungs-Fragmentation zu Zellen mit *Protococcales*-Charakter. Bildung und Regeneration der Hyperfragmente können mit den bei den Bakterien bekannten ähnlichen Vorgängen in eine Parallele gebracht werden.

Bei Untersuchung des Zerfalls der Zellorganisation in den einzelligen grünen Pflanzen machte ich im Laufe der letzten Jahre die Feststellung, dass der Zellzerfall, die »Zerbröckelung der Plasmen«, bei weitem nicht in jedem Falle eine vollständige Zerstörung der lebenden Zellsubstanz bedeutet, da sich im Laufe des allmählichen Verschwindens der Zellsubstanz winzig kleine, ihre Lebensfähigkeit auch fernerhin bewahrende, grüne Plasmakügelchen entwickeln können, die nicht nur zur Photosynthese, sondern — nach einem gewissen Entwicklungsgang — auch der Vermehrung fähig sind [8]. Diese Plasmateilchen wurden von mir Hyperfragmente genannt, da ihre Bildung fragmentativen Charakter zeigt und der Zerfall sich manchmal fast an der Grenze der lichtmikroskopischen Wahrnehmung bewegt oder sich fallweise auch darüber hinaus fortsetzt. Im Falle von *Scenedesmus*, *Ankistrodesmus*, *Kirchneriella*, *Dactylococcus* (nach PASCHER *Keratococcus*) und *Chlamydomonas* konnten wir u. a. feststellen, dass gewisse Teilchen der Zellzerfallsprodukte, gewöhnlich nach Hervorbringung von einigen Hyperfragment-Generationen, unter günstigen Umständen fähig sind, sich zu den ursprünglich zerfallenen Zellen ähnlichen oder auch zu von diesen abweichenden Zellen zu entwickeln.

Von der Mitte der 30-er Jahre an beschäftigen wir uns mit der Erscheinung, dass die zerfallende organische Substanz in der zugrundegehenden Massenkultur der einzelligen Pflanzen (Wasserblüte, flos aquae) stets grünliche Teilchen mit einem Durchmesser von 0,5—3 μ enthält, die infolge ihrer grünen Farbe und ihrem winzigen Masse den Chlorobakterien sehr ähnlich sind bzw. mit diesen leicht verwechselt werden können. Besonders zahlreich können diese Körper-

chen nach der Massenproduktion von grünen *Flagellaten*, *Protococcalen* und *Chlamydomonas*-Typen erscheinen. Im Frühjahr 1937 konnte ich in Kőszeg (Kom. Vas) die Beobachtung machen, dass nach einer Massenproduktion von *Trachelomonas-Scenedesmus* eine derart unübersehbare Menge von 1—2 μ grossen grünen Körperchen auftrat, dass das Wasser während des ganzen Sommers und Herbstes gelbgrün gefärbt war. Für diese Sukzessionserscheinung konnte ich keine befriedigende Erklärung finden. Meine Ansicht, es könnte sich bei diesen grünen Kügelchen vielleicht um die Zerfallsprodukte der die Wasserblüte bildenden *Scenedesmus*-Zellen handeln, war zwar eine ganz natürlich begründete, konnte aber in der damaligen, der monomorphischen Theorie huldigenden Zeit nicht nur nicht durchdringen, sondern wurde sogar vielseitig als »Hirngespinst« bezeichnet. Es ist möglich, dass sich später im Laufe der Kulturuntersuchungen einige für Chlorobakterien geltende grüne Körperchen als Zellzerfallsprodukte erweisen werden.

In Gewässern mit H_2S-Gehalt, die zerfallende organische Stoffe enthalten und für die — der Literatur gemäss — die Chlorobakterien besonders charakteristisch sind, können nämlich diese grünen Körperchen tatsächlich in sehr grossen Mengen vorkommen. Im Laufe meiner bisherigen Untersuchungen konnte ich jedoch im allgemeinen noch die Feststellung machen, dass es sich bei den auf der Schlammoberfläche sammelbaren grünen oder blaugrünen Plasmateilchen um keine Chlorobakterien handelt. Die kugel-, kipfel- oder manchmal stäbchenförmigen Objekte entwickelten sich nämlich in den Kulturen entweder zu Zellen bzw. Hyperfragmenten oder aber gingen zugrunde und sind in diesem Falle als lebensunfähige, auch in den Teilfunktionen allmählich degenerierende (untergehende) Zerfallsprodukte zu betrachten. In diesem Zusammenhang verdient erwähnt zu werden, dass eine der bezeichnendsten und ältesten Arten im heutigen System der Chlorobakterien *(Chlorobium limicola)* von ihrem Entdecker NADSON selbst als ein Objekt unbestimmten Charakters bezeichnet wurde. GEITLER und PASCHER [4] berichten darüber: »Nach NADSON nimmt der Organismus eine Mittelstellung , . . . zwischen niederen einzelligen Chlorophyceen (wie z. B. die kleinsten Formen von *Stichococcus bacillaris)* und den Bakterien' ein.« Dieses Objekt wurde von NADSON in der Schlammoberfläche gefunden. Seine Beschreibung, von der wir annehmen müssen, dass sie auf empirischer Grundlage beruht, verwirrt den Systematiker dadurch, dass zwischen den grünen Algen, als Organismen mit Zellkern, und den Bakterien wesentliche Verschiedenheiten in der Organisation bestehen bzw. dass im philogenetischen Pflanzensystem kein zwischen den grünen Algen und den Bakterien stehender Pflanzen-Typus bekannt ist.

LEPESCHINSKAJA [11] untersuchte die Zellentwicklung. Die infolge des Zellzerfalls entstehenden und regenerationsfähigen Teilchen sind bei den Bakterien schon seit langem bekannt. Diese Teilchen pflegt man heute als Gonidien (G-Formen), als filtrierbare virusartige bzw. avisuelle Formen zu betrachten.

PERTY machte bereits vor mehr als 100 Jahren, 1852, die Beobachtung, dass sich aus den Zellen von *Spirillum* an der Grenze der mikroskopischen Wahrnehmung stehende kleine Teilchen, »Blastiene« bilden, aus denen sich neuerdings *Spirillum*-Zellen entwickeln. Später wurden von sehr vielen Forschern ähnliche Teilchen beobachtet. Die in den Kulturen häufig erscheinenden, aufgedunsenen und der Form nach veränderten, sog. »Involutions-Formen« [1] sind oftmals mit *Granulen* gefüllt, welch letztere ebenfalls fähig sind, sich in Zellen zu verwandeln. LÖHNIS ist der Ansicht, dass die Entstehung der filtrierbaren Teilchen bei allen Bakterien festgestellt werden kann. Ihre durchschnittliche Grösse beträgt 0,2 μ. Sie können sich durch vegetative Teilung vermehren und demzufolge als »gonidiale Generation« längere Zeit auch in ihrer »avisuellen« Form existieren. Ihr Gehalt an Desoxyribonukleinsäure ist sehr gross, ihre enzymatische Fähigkeit minimal, hingegen ihre Resistenz eine hochgradige. Im allgemeinen entstehen sie unter ungünstigen Umständen und ihre biologische Bedeutung besteht einerseits darin, dass sie den Weiterbestand der Bakterien-Art auch unter ungünstigen Bedingungen sicherstellen, anderseits aber können sie auch in der Transformation der *Art* eine gewisse Rolle spielen (undifferenzierter Zustand, etwaige Hybridisation in nicht zelliger Periode, Lenkbarkeit durch Extrakte). In Ungarn haben JUHÁSZ, VADÁSZ, sowie SINKOVICS derartige Untersuchungen durchgeführt [6, 7, 16].

Auch die Frage der »regressiven Evolution«, die mit dem Ursprung der Viren im Zusammenhang steht, soll kurz erörtert werden. Demnach haben wir die Viren als Resultate von Vereinfachung der parasitären Bakterien zu betrachten bzw. als Extremfälle [16] des bis zum Eiweiss-Molekül erfolgten Abbaus der Bakterienzelle. In diesem Zusammenhang können die Feststellungen SCHANDERLS [14, 15] erwähnt werden, wonach sich das Plasma beim Zerfall der Pilze und der Pflanzenzellen höherer Ordnung in Bakterien verwandelt. Der Forscher vertritt die Ansicht, dass die aus dem Sporangium der *Mucor*-Arten isolierten oder freigewordenen Chondriosomen nicht nur auf einem Nährboden gezüchtet werden, sondern sich auch in Bakterien transmutieren können. SCHANDERL beruft sich auch auf ENDERLEIN, der die aus den *Aspergillus*-Chondriten sich entwickelnden Teilchen für echte Tuberkulose-Bakterien hielt. Beide Theorien stellen also die Philogenetik (Stammesentwicklung) von Bakterien in Abrede. Noch mehr bezweifelt wurde jene Mitteilung SCHANDERLS, wonach sich auch aus dem Plasma von Pflanzen höherer Ordnung Bakterien bilden können und sich ausser den Chondriosomen auch die Substanz der Plastis und des Zellkerns in Bakterien verwandeln kann. Es bietet sich uns hier keine Möglichkeit einer Auseinandersetzung mit dieser problematischen und die fortschreitende Entwicklung in Abrede stellenden Theorie und den mit ihr zusammenhängenden anderen Anschauungen. Immerhin ist es möglich, dass sich die Erscheinung des die weiter lebenden Teilchenproduzierenden Zellzerfalls auch bei den Pilzen beobachten lässt.

Es stehen uns auch Angaben über die partielle Funktionsfähigkeit der einzelnen Zellbestandteile zur Verfügung. So konnte z. B. festgestellt werden, dass die mit Ultrazentrifuge aus dem Plasma herausgerissenen und mit Differentiations-Zentrifugierung isolierten Mitochondrien weiter atmen [3, 10] oder die nach der Zerstörung der Pflanzenzellen isolierten Chloroplasten einer weiteren Oxygenproduktion fähig sind [5, 13]. In dieser partiellen Funktionsfähigkeit darf jedoch noch keine wirkliche Lebensfähigkeit gesehen werden. Das sicherste Zeichen selbständiger Lebensfähigkeit ist dann gegeben, wenn sich eine Züchtung auf dem Nährboden als möglich erweist.

Bei der eingehenden Beschreibung unserer eigenen Untersuchungen soll vor allem bemerkt werden, dass diese nur den ersten Schritt auf einem diesbezüglich noch unbekannten Gebiet (Chlorophyceen) bedeuteten. Es konnte festgestellt werden, dass die aus dem Zerfall von einigen, in die Klasse der Chlorophyceen gehörenden, einzelligen Organismen stammenden Plasmateilchen nicht nur funktionsfähig, sondern unter Umständen tatsächlich auch lebensfähig sind, also nicht nur photosynthetisieren, sondern sich auch zu Zellen entwickeln können, wobei sie kleinere und grössere Veränderungen von manchmal scheinbar extremem Ausmass durchmachen. Im folgenden gebe ich die Beschreibung der mit der grünen Alge *Chlamydomonas intermedia* durchgeführten diesbezüglichen Untersuchungen. Der Methodik nach bestand diese Arbeit aus drei Phasen.

I. In erster Reihe mussten wir uns darüber Gewissheit verschaffen, ob sich die beim Zerfall der zelligen Struktur erscheinenden Körperchen tatsächlich aus dem Plasma entwickeln d. h. nicht als Resultat einer schnellen Vermehrung von im Biotop bereits auch früher vorhandenen anderen Mikroorganismen, z. B. Chlorobakterien, in Erscheinung treten. Im Laufe der Untersuchungen mussten wir daher trachten, nicht nur die Endphase der Zellzerstörung und die weitere Vermehrung der bereits vorhandenen Teilchen auf verlässliche Weise festzustellen, sondern auch die dazwischenliegenden Phasen in der Entwicklung dieser Teilchen zu klären und zu fixieren. Am Anfang bedeutet das in erster Reihe ein morphologisches Problem.

II. Die zweite Aufgabe, also die Untersuchung der Umwandlung der Hyperfragmente zu Zellen, besteht aus zwei Teilen: vor allem galt es, die Bedingungen zu klären, unter denen die Entwicklung zur Zelle erfolgt und dann die einzelnen Entwicklungsphasen zu fixieren.

III. Die im Laufe der Zellausbildung zu beobachtende Veränderlichkeit musste mit Hilfe von Klon-Kulturen untersucht werden.

Im Laufe der Untersuchungen stellten sich alle Anfangsschwierigkeiten ein. Die Kontinuität der Kultivierung, die Sicherung der Lebensbedingungen sind Probleme, deren Lösung bei den autotrophen grünen Pflanzen wesentlich schwieriger ist, als z. B. bei den Bakterien. Auch die Feststellung der optimalen Lichtverhältnisse und des entsprechenden Nährbodens erheischte gesonderte Versuche. Der Ablauf des Prozesses könnte am besten mit Hilfe der mikro-

kinematographischen Methode gezeigt werden. Eine grundlegende Schwierigkeit scheint sich jedoch aus dem Umstand zu ergeben, dass die Bildung der Teilchen, ihre Vermehrung und Umwandlung in Zellen eine bedeutend längere Zeit — im allgemeinen Monate — beansprucht, als die ähnlichen Vorgänge bei den Bakterien. In diesem Anfangsstadium war ich also bestrebt, die bezeichnendsten Phasen der Entwicklung mit Hilfe von annehmbaren mikrophotographischen Aufnahmen zu demonstrieren.

I. Der Zellzerfall und das Wesen der Hyperfragmente

Noch weniger geklärt sind die physiologischen Umstände des Zellzerfalls. Nach meinen bisherigen Erfahrungen erscheint in erster Reihe die Anhäufung der Stoffwechselprodukte im Nährboden von entscheidender Wichtigkeit.

Abbildung 1, Tafel I zeigt den Anfangsgrad der Zellschädigung. Aus den Zellen ist das Stigma bereits verschwunden und auch die Flagellen sind abgeworfen. Hingegen sind die pulsierenden Vacuolen in Form von hellen Flecken, auf der vorderen, schmäleren Seite der Zellen noch deutlich erkennbar. Ungefähr in der Mitte der Zelle, ein wenig seitlich verschoben, ist der Pyrenoiden-Ring zu sehen, der — als bezeichnendstes und am leichtesten erkennbares Merkmal — bei der Identifizierung der *Chlamydomonas*-Zellen später im allgemeinen eine wichtige Rolle spielen wird.

Das Verschwinden des Vacuolen-Systems bezeichnet den zweiten Grad der Zellschädigung. Im Zusammenhange damit treten irreversible Veränderungen auf: chondriosomähnliche Granulen erscheinen in immer grösserer Anzahl und auch die einheitliche, die innere Oberfläche der Zelle zum Grossteil bedekkende Plastis beginnt zu zerbröckeln. Um diese Zeit ist die Nährflüssigkeit bereits in grossem Masse luftlos und die Zerfallserscheinungen treten in den Vordergrund. In mehreren Fällen wurde die Beobachtung gemacht, dass die auf Agar-Platten angebrachten normalen Zellen meistens keine Schädigungen aufweisen bzw. die Lysis der geschädigten Zellen in luftigem Milieu langsamer wird oder aufhört. Die weiteren Veränderungen zeigen einen mehr endogenen oder exogenen Ablauf. Eine scharfe Grenze zwischen beiden kann jedoch nicht gezogen werden.

1. *Endogene Hyperfragmentation* (Textabbildung 2a) lässt sich meist in Kulturen mit flüssigem Nährboden beobachten. Wie Abbildung 5, Tafel I, zeigt, bilden sich im ganzen Volumen der Zellen Granulen von 1—3 μ Durchmesser. Nach der Auflösung der Zellmembrane bzw. des zugrundegehenden Cytoplasmas werden diese Teilchen frei und können eine Zeit lang noch schwache Tanzbewegung ausführen. In diesen Teilchen liess sich bisher keine Kernsubstanz nachweisen.

2. *Exogene Hyperfragmentation* (Textabbildung 2b). Diese ist die häufigste Zerfallsweise. Aus Abbildung 2, Tafel I, geht hervor, dass die Plastis der

Tafel I

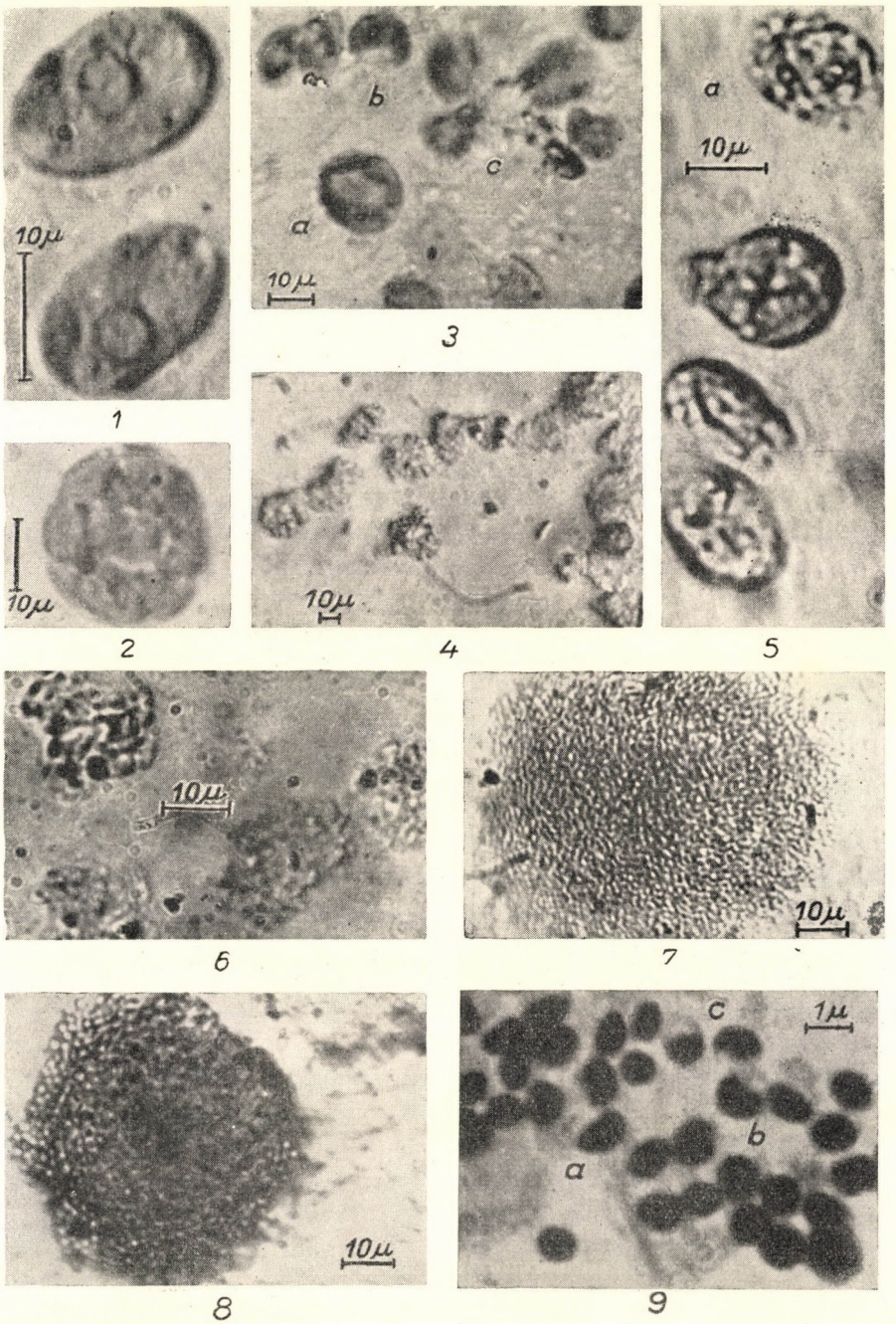


Abb. 1. Die Zellen von *Chlamydomonas intermedia* nach dem Verlust der Flagellen. 1700 : 1. *2.* Anfang der Hyperfragmentation der Zellen. 900 : 1. *3.* Die verschiedenen Phasen des

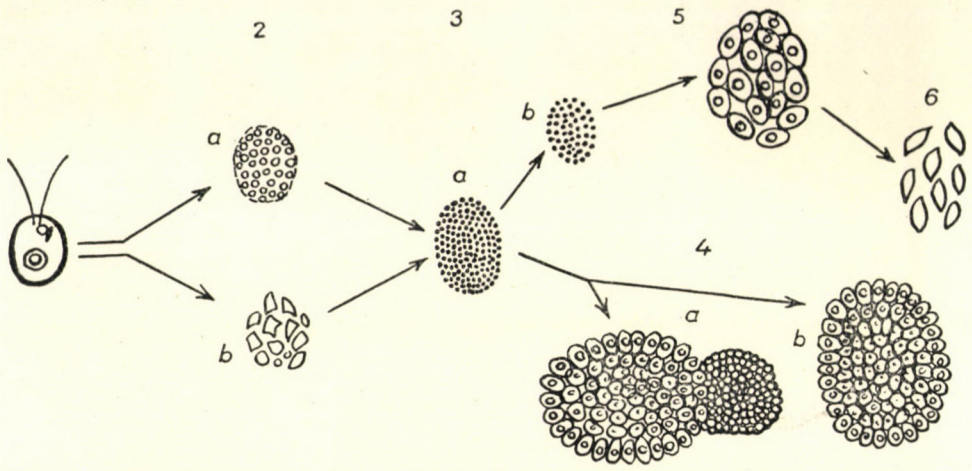


Abb. 1. Chlamydomonas-Zelle. *2.* Zerfall von *Chlamydomonas*-Zellen. a) Zerfall endogenen Charakters, b) Zerfall exogenen Charakters, *3.* a) An Stelle zugrundegehender Zellen erscheinende Körperchen, b) Teilchen aus Klon-Kulturen *4.* Ein »Riesenlager« aus Zellen mit *Chlamydomonas*-Charakter (Nach dem Zerfall der Zellen auf Agar). a) Ausbreitung mittels eines »pseudopodium-artigen« Fortsatzes, b) »Riesenlager« ohne »pseudopodium-artigen« Fortsatz, *5.* Kleines Lager aus Zellen mit *Chlamydomonas*-Charakter, die aus Klon-gezüchteten Hyperfragmenten entstanden, *6.* Die Fragmentation der Zellen mit *Chlamydomonas*-Charakter des vorigen Lagers zu Zellen mit *Protococcales*-Charakter

sich abrundenden Zelle in grössere Teile zerfällt, ohne dass chondriosomartige Granulen entstehen würden. In der zerfallenden Substanz setzt sich die Zerbröckelung weiter fort. Dies ist aus Abbildung 3, Tafel I, ersichtlich. Bei Zelle »a« ist nur noch der Anfang der inneren Zerbröckelung wahrzunehmen, während Zelle »b« bereits zur Hälfte verschwunden ist. Demgegenüber veranschaulicht Teil »c« die exogene Zerbröckelung der Zellsubstanz.

Um die Erscheinungen besser beobachten zu können, wurde etwas von der in der ursprünglichen Nährflüssigkeit befindlichen zerfallenden Substanz auf Agar-Platten angebracht, wodurch sich die Möglichkeit ergab, auch mikrophotographische Aufnahmen von den bezeichnendsten Phasen des Zerfalls herzustellen. Das in Petri-Schalen gelegte Agar wurde meistens mit einer 20fach verdünnten KNOPschen Lösung hergestellt. Die Bakterien konnten unter Anwendung von Penicillin nur teilweise eliminiert werden. In der mit Penicillin behandelten Substanz erfolgte der Zerfall etwas langsamer und die Kulturen zeigten manchmal eine auffallende Verpilzung.

Zerfalls der *Chlamydomonas*-Zellen. 550 : 1, *4.* Lysis der auf Agar-Platten angebrachten Zellreste. 250 : 1, *5.* Endogene Hyperfragmentation. 1000 : 1, *6.* Zerfall von auf Agar-Platten angebrachten Zellresten. 900 : 1, *7.* Bildung eines Hyperfragment-Lagers auf Agar-Platten. 650 : 1, *8.* Im Wachstum befindliches Hyperfragment Lager auf Agar-Platten. 720 : 1. *9.* Entwickelte Hyperfragmente. 3600 : 1

Mit gespanntem Interesse verfolgten wir den Ablauf des Zerfalls. An der Zerbröckelung ist nämlich auch die Plastissubstanz beteiligt, aus der sich — nach Ansicht SCHANDERLS — Bakterien bilden können. Wenn auch hier über eigene Bewegungsfähigkeit verfügende Bakterien entstehen, müssten wir offenbar der Ansicht SCHANDERLS beipflichten. Das hiesse ganz allgemein, dass die biologischen Objekte, die unter der Bezeichnung Bakterien zusammengefasst werden, nichts Anderes sind, als die Zerfalls-, Degradationsprodukte höherer organisierten Formen der lebenden Substanz, höherer pflanzlicher und tierischer Organismen. In diesem Fall sind die Bakterien nicht die Anfangskettenglieder einer progressiven Reihe der Philogenetik (Stammesentwicklung), sondern das Resultat einer regressiven, wenn man so sagen darf »retrograden Entwicklung«, einer auch jetzt anhaltenden, in jedem Augenblick vor sich gehenden »Regression«. Die Bakterien sind also solche in Umwandlung begriffene Eiweiss-Anhäufungen, die — wenn sie in kleinere Teile zerfallen — zu Feinden und Auflösern der höheren Organisation werden.

Abbildung 4, Tafel I, stellt den Zerfall der auf Agar-Platten angebrachten Zellreste dar. Jede Anhäufung ist die Plasmasubstanz je einer exogen zerfallenden Zelle. Ebenda zeigt Abbildung 6 eine Anhäufung in 1080facher Vergrösserung. Die Plasmasubstanz ist zum Grossteil bereits vernichtet. Die noch vorhandenen 1—2 μ grossen Granulen können auf Grund ihrer reinen grünen Farbe in erster Reihe als Reste der Plastis betrachtet werden. Die Plastis ist der an Lipoiden reichste Teil der Zelle, weshalb die einzelnen Stücke derselben der Lysis lange widerstehen. Die ei-, stäbchen- oder Y-förmigen Teilchen vollführen im Wasser gleichfalls eine schwache tanzende Bewegung, d. h. sie sind den Objekten ähnlich, die sich nach SCHANDERL in Bakterien verwandeln. Im gegebenen Fall zerbröckelten jedoch diese Teilchen weiter und an ihre Stelle trat eine abgestorbene bräunliche Substanz. Braun- und Gelb-Werden sind Anzeichen des Verfalls. Zwischen den verfallenden Teilchen erscheinen jedoch hie und da auf der Oberfläche des Agars blaugrüne oder grün schattierte Flecke. Diese Flecke können manchmal leicht hervortreten, doch gehen sie meistens ebenfalls zugrunde. Manchmal können zwischen den bräunlichen Flecken der Plasmareste auch sehr kleine grünlich gefärbte Plasmakügelchen von 0,5—1 μ Durchmesser auftreten. Es erscheinen die ersten Hyperfragmente, die durch Teilung eine thallusähnliche Bildung (Lager) aufweisen. Die Einzelheiten über die Entstehung dieser Körperchen sind noch nicht näher bekannt. Vermutlich entwickeln sich die lebensfähigen Teilchen im Laufe des Zerfalls. Sonderbarerweise sind die den Hyperfragmenten sehr ähnlichen, 1—2 μ grossen, lebhaft grün schillernden Teilchen auch bei einzelnen Amöben anzutreffen. Bei diesen Teilchen dürfte es sich offenbar um die noch nicht verdauten (den Enzymen der Amöben widerstehenden) Teile der verschluckten Algenreste handeln. Bezeichnend ist auch der Umstand, dass die auf Agar-Platten gelegte Amöbe ihre Bewegungsfähigkeit verliert und sich ihr Plasma — wahrscheinlich infolge der

Lysis der Granulen — blaugrün oder gelbgrün verfärbt. Entwicklungsfähigkeit konnte bei diesen grünen Körperchen bisher nicht beobachtet werden.

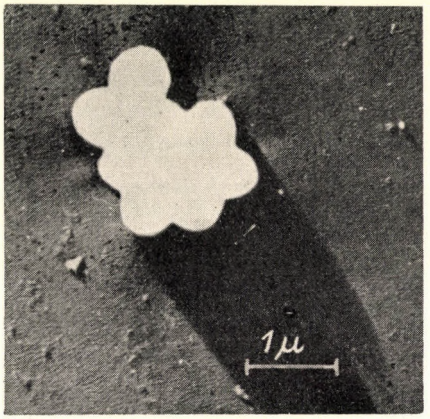
Die weitere Beobachtung der nach dem Zerfall der Zellen entstandenen grünen Kügelchen konnte die Ansicht SCHANDERLS nicht bestätigen. Aus den Teilchen bildeten sich keine Bakterien. Die ungefähr 1 μ großen Kügelchen nahmen unter günstigen Umständen immer mehr an Umfang zu, in ihrem Inneren erfolgte jedoch eine entschiedene Differenzierung. Sie entwickelten sich zu Zellen. Die entwickelten Zellen zeigen anfangs eher *Chlamydomonas*-Charakter, zerfallen aber später meistens in *Protococcales- (Chlorococcales)* ähnliche Zelltypen.

Bevor wir den Vorgang der Umwandlung von Hyperfragmenten zu entwickelten Zellen beschreiben, untersuchen wir kurz ihre Eigenschaften in morphologischer und physiologischer Hinsicht. Aus den auf Agar-Platten angebrachten Zellresten vermehrten sich die Hyperfragmente anfänglich mit äusserster Schnelligkeit, und es entwickelten sich kleinere und grössere Lager von Hyperfragmenten. Die Teilchen des in Abbildung 7, Tafel I, dargestellten Lagers haben einen Durchmesser von ungefähr 1 μ. Das Lager, das uns Abbildung 8 zeigt, ist schon besser entwickelt, besteht aus Hyperfragmenten mit einem Durchmesser von 1,5—1,8 μ. Solche Teilchen vermehrten sich — in KNOPsche Lösung überimpft — noch innerhalb ihrer eigenen Kategorie, d. h. brachten wieder Hyperfragmente hervor. Umwandlung in Zellen liess sich nur im Laufe des weiteren Wachstums beobachten, nachdem eine Grösse von 2,5—3 μ erreicht war. Klons von Hyperfragmenten konnten auf zwei Arten gewonnen werden :

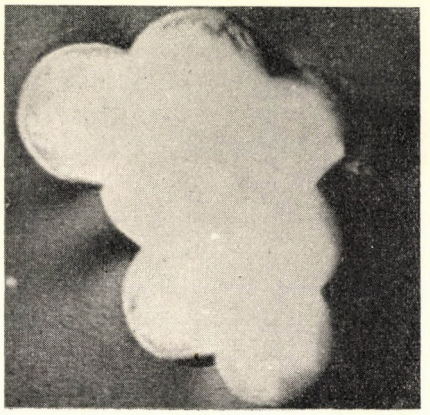
a) Durch mehrmals wiederholte Überimpfung. Die an der Stelle der Zellreste erscheinenden Hyperfragment-Lager legte ich von der Agar-Platte in eine 20—50fach verdünnte KNOPsche Lösung. Ich brachte die stark verdünnte Suspension der am Boden des Reagenzglases nach einigen Wochen (eventuell nach 1—2 Monaten) angesammelten Hyperfragmente auf Agar-Platten an, übertrug die aus den einzelnen Teilchen entstandenen Lager neuerdings in Flüssigkeit und vermehrte sie. Meistens gelang es durch 2—3malige Übertragung auch die Bakterien zu eliminieren, doch wird eine beliebig oft vorgenommene Überimpfung der Hyperfragmente durch den Umstand verhindert, dass sich nach 2—3maliger Übertragung das Tempo der Teilung verlangsamt bzw. dass sich die Hyperfragmente schnell zu Zellen entwickeln. In dieser Erscheinung kommen wahrscheinlich Entwicklungs- (Alterungs-) Prozesse zum Ausdruck.

b) Durch wiederholte Hyperfragmentation sich entwickelnde Zellen. Abbildung 26, Tafel V, stellt ein aus einem Hyperfragment entstandenes Lager dar. Die Zellen degenerierten jedoch wieder vor der vollständigen Entwicklung und zerfielen in ihrer Gänze. Der Durchmesser der Teilchen beträgt 1—2 μ. Der Umstand, dass während des Rückfalls in der Entwicklung jede einzelne Zelle des Lagers in gleichem Mass zerfiel, deutet auf die gleiche Art der Zellen bzw. auf den gemeinsamen (Klon) Ursprung derselben.

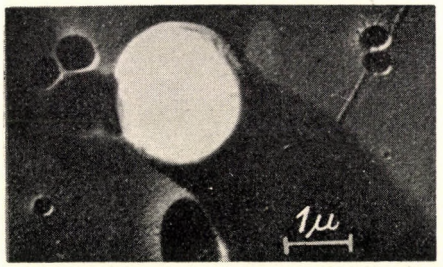
Tafel II



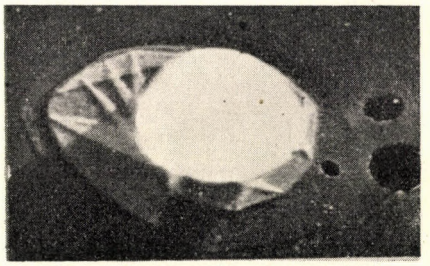
10



11



12



13

14

Abb. 10. Unentwickelte Hyperfragmente. 11 000 : 1 (Gesamtvergrösserung), *11—12.* Bes-

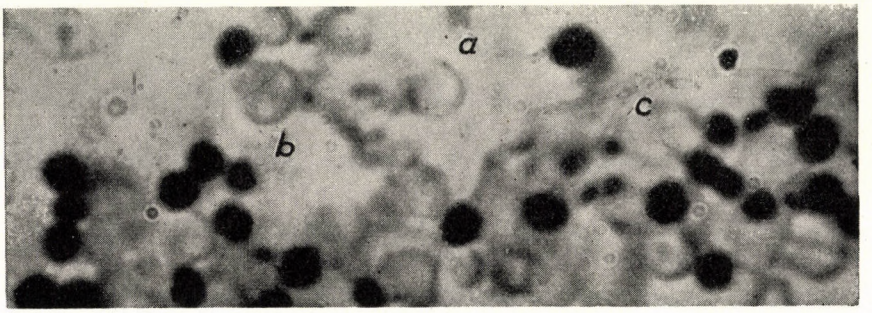
Die Morphologie der Hyperfragmente konnte durch unmittelbare Photographierung der 1800—3000fachen Immersionsvergrösserungen und mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen in den Hauptzügen festgestellt werden. Bei der lichtmikroskopischen Photographierung erwies sich die Färbung mit Methylviolett als die geeignetste. Abbildung 9, Tafel I, zeigt kugel- und eiförmige Fragmente in 3600facher Vergrösserung. Die eiförmigen Teilchen (a—b) können leicht gewölbt sein. Infolge der Einschrumpfung des Plasmas wird die Oberflächenhaut des Teilchens »c« sichtbar.

Die Untersuchung der morphologischen Verhältnisse wurde eigentlich durch die im Elektronenmikroskopischen Laboratorium der Ungarischen Akademie der Wissenschaften hergestellten Aufnahmen ermöglicht. Nach den auf Tafel II dargestellten elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind die Hyperfragmente meistens kugelförmig, manchmal eiförmig oder ein wenig zusammengedrückt (Abb. 12 und 13). Ihre gruppenartige Anordnung ist bloss ein infolge der Präparierung entstandenes Kunstprodukt (Agglomeration). Die Aufnahmen ermöglichten, auch die Masse der Teilchen genauer festzustellen. Abbildung 10 zeigt ein Hyperfragment mit einem Durchmesser von 0,7 μ (11 000fache Vergrösserung). Die übrigen Aufnahmen veranschaulichen Hyprefragmente mit einem Durchmesser von 1,5—2,5 μ. Die Abbildungen 12 und 14 wurden mit 8800facher, die Abbildungen 11 und 13 mit 11 000facher Gesamtvergrösserung hergestellt. Auch eine strukturelle Eigenschaft fällt auf, nämlich das Vorhandensein der Oberflächenhaut. Es hat jedoch den Anschein, dass diese Haut nur bei einem gewissen Grad der Entwicklung erscheint und zwar wenn der Durchmesser eine Grösse von ungefähr 1,5 μ erreicht hat. Bei den Teilchen, deren Durchmesser nur 0,7 μ beträgt (Abb. 10), ist noch keine Haut zu sehen. Die Oberflächenhaut kam, wie auf den Abbildungen 11, 12 und 14 ersichtlich, infolge der Einschrumpfung des Plasmas, bzw. infolge der Ablösung des Plasmas von der Oberflächenhaut zustande. Abbildung 14 zeigt eine Ablösung mit ausgesprochen konkavem Charakter. Aus dem Faltenwurf der während der Ablösung zerreissenden Haut (Abb. 13 und 14) können wir auf deren weichen elastischen Charakter folgern. Unsere 1951 an den Hyperfragmenten von *Scenedesmus* durchgeführten Untersuchungen [8] stimmen mit den vorangehenden Feststellungen im grossen und ganzen überein. Die Oberflächenhaut kann auch bei den Hyperfragmenten von *Scenedesmus* nur im entwickelten, kipfelförmigen Zustand beobachtet werden.

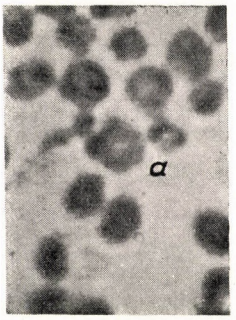
Der Teilung der Hyperfragmente geht sowohl bei *Scenedesmus*, als auch bei *Chlamydomonas* ein gewisser sehr primitiv anmutender Entwicklungsvorgang voraus. Teilchen, die bereits eine Grösse von 2—2,5 μ erreicht haben, verflachen sich ein wenig, werden dann in der Mitte oder eher ein wenig rand-

ser entwickelte Hyperfragmente mit Oberflächenhaut. 10 = 11 000 : 1, 12 = 8800 : 1, *13—14.* Faltenwurf und Riss der Oberflächenhaut. 13 = 11 000 : 1, 14 = 8800 : 1
Elektronenmikroskopische Aufnahmen. (Präpariert von LOVAS, aufgenommen von MERSVA.)

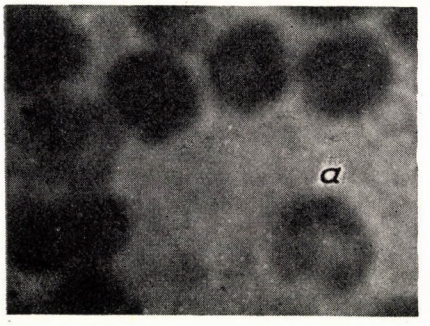
Tafel III



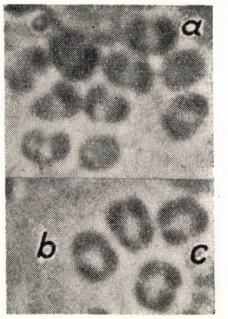
15



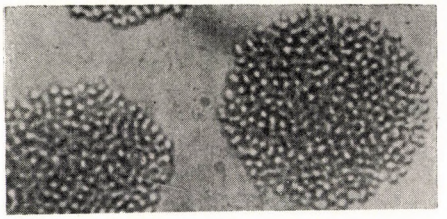
16



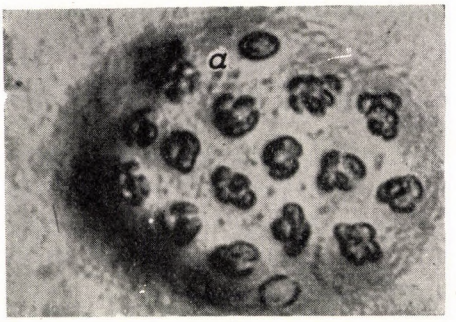
17



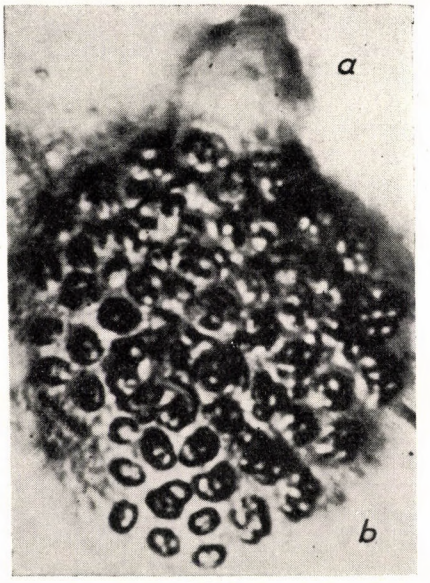
18



19



20



21

Abb. 15. Aus einer Oberflächenhaut-Hülse stammende herausgetretene Hyperfragmente. 3600 : 1; *16—18.* Teilungsformen von Hyperfragmenten. 16, 18 = 2500 : 1; 17 = 7200 : 1

wärts löcherig, wodurch kipfel- oder halbmondförmige Teilchen entstehen. Diese Teilchen sind jedoch nicht mehr unversehrt, da sie, wie bei den Teilchen »a« auf den Abbildungen 16 und 17, Tafel III, zu sehen ist, mit einer Quereinschnürung oder unregelmässig, in kleinere Kügelchen zerfallen, manchmal sogar ganz zerbröckeln. Es ergibt sich nun die Frage, ob ein derart beträchtlicher Zerfall der Hyperfragmente noch lebensfähige Teilchen produziert? Die Produkte des Hyperfragment-Zerfalls sind nämlich im allgemeinen wesentlich kleiner als 0,5 μ. Abbildung 18 veranschaulicht deutlich den teilungsartigen Zerfall der Hyperfragmente. Die zentrale Vertiefung ist auf dem oberen Teile der Photoaufnahme, bei dem Teilchen »a« noch zu beobachten, obwohl die Teilung in zwei Teile — infolge einer bipolaren Durchspaltung der Vertiefung — bereits zum Abschluss gekommen ist. Eine solche Teilung konnte auch bei den *Scenedesmus*-Hyperfragmenten festgestellt werden. Dieselbe Abbildung veranschaulicht den weiter fortgeschrittenen Zerfallszustand des mit »b« bezeichneten Teilchens. Nach der ersten Teilung spaltete sich die untere Häfte senkrecht auf die vorige, so dass drei Teilchen entstanden. Eine zweimal nacheinander sich wiederholende Teilung, also die Entstehung von vier Teilchen weisen die mit »c« bezeichneten Hyperfragmente auf. Abbildung 15 stellt unter den Bezeichnungen »a« und »b« leere Hülsen von Hyperfragmenten dar. Unter der Bezeichnung »c« sind ebenfalls sehr kleine Teilungsprodukte festzustellen und zwar gleichfalls in einer 3600fachen Gesamtvergrösserung. Die Grösse der Teilchen beträgt hier ungefähr 0,5 μ.

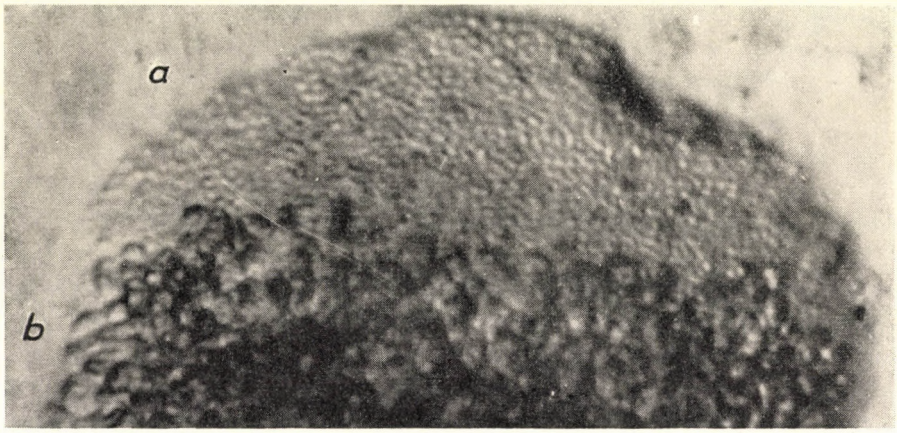
In bezug auf die Physiologie der Hyperfragmente ist vor allem ihre bedeutende Resistenz erwähnenswert. Sie besitzen die Fähigkeit, auch die Austrocknung und beträchtliche Anhäufung der Stoffwechselprodukte zu ertragen. Durch die in KNOPsche-Lösung erfolgte Überimpfung wurde das Tempo der Vermehrung im allgemeinen beschleunigt. Auch die Resistenz der Hyperfragmente lässt darauf schliessen, dass es sich bei diesen Teilchen um organisierte Stücke der zerfallenen Zelle handelt, die unter den gegebenen ungünstigen Verhältnissen noch weiterleben können.

II. Die Ausbildung der Zellen

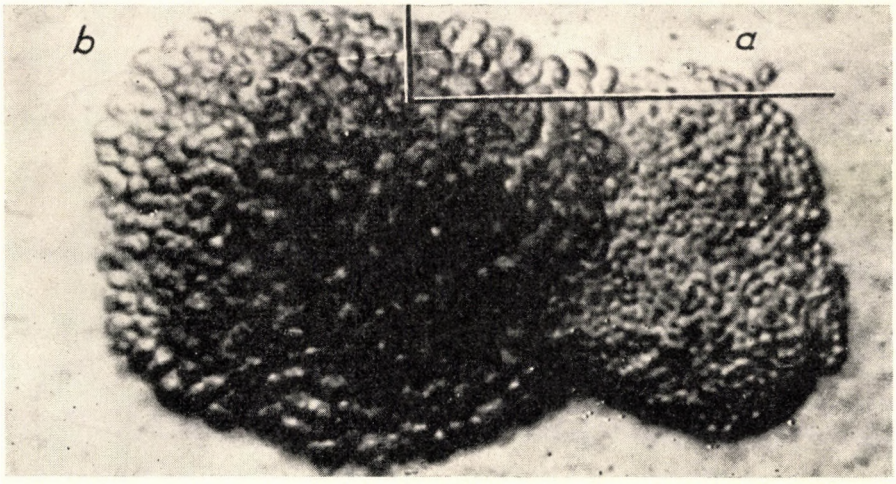
Die Umwandlung der Hyperfragmente von *Scenedesmus* zu Zellen vollzog sich auch in der verdünnten KNOPschen Lösung. Hingegen wurde bei *Chlamydomonas* die Erfahrung gemacht, dass sich dieser Vorgang nur dann vollzieht, wenn Hyperfragmente auf einen festen Nährboden angebracht werden. Das

19. Entwicklung von Klon-gezüchteten Fragmenten auf Agar. 480 : 1, *20.* Auf der Oberfläche eines hyalinen Hügelchens entstehende Zellgruppen auf Agar. 480 : 1, *21.* Ausbreitung eines am Anfang der Entwicklung stehenden Lagers mit »pseudopodiuumartigem« Fortsatz. 500 : 1

Tafel IV



22



23

24

mit 20—30fach verdünnter KNOPscher-Lösung gekochte Agar erwies sich als entsprechender Nährboden.

Der erste bestimmte Schritt zur Zellwerdung war bei Erreichung einer Grösse von ungefähr 4—5 μ zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt erschien die Plastis und auch das noch schollenartige Pyrenoid begann sich zu differenzieren, ein ausgesprochener Zellkern war jedoch damals noch nicht nachweisbar. Die FEULGEN-Reaktion liess bloss einige kleine gefärbte Schollen sichtbar werden. Manchmal fehlten jedoch auch diese. Dieser Zustand ist in den Aufnahmen 19—20, Tafel III, veranschaulicht.

In der Ausbildung der aus Zellen mit *Chlamydomonas*-Charakter bestehenden Lager zeigt sich jedoch ein gewisser Unterschied, je nachdem, ob diese Ausbildung an der Stelle der Zellreste »autochton« begann, oder aber von den auf Agar-Platten angebrachten Teilchen der Hyperfragment-Klons ausging.

1. *An der Stelle der Zellreste erfolgte Entwicklung* (Textabbildung 4a—b). Dieser Fall ist meistens durch die grossen Masse des Lagers, durch die bedeutende Ausbuckelung desselben auf der Oberfläche der Agar-Platte und häufig durch die mit »pseudopodium-artigen« Fortsätzen vor sich gehende Ausbreitung des Lagers charakterisiert. Die grosse Ausdehnung des Lagers kann damit erklärt werden, dass sich die an der Stelle der Zellreste erscheinenden Hyperfragmente — wie bereits erwähnt — anfänglich nur in ihrer eigenen Kategorie, d. h. als Hyperfragmente vermehren und zwar häufig so, dass sie auch von mehreren Zentren ausgehen. Die Hyperfragmente können nämlich zwischen den zugrundegehenden Flecken der Zellreste auch an mehreren Stellen erscheinen und sich weiter vermehrend ein ausgedehnteres Lager bilden.

Die eigentümliche Ausbuckelung der Lager ist auf zwei Ursachen zurückzuführen:

a) Die zentralen, also frühesten Teile des Lagers bestehen immer aus mehr Zellschichten, als die sich ausbreitenden Randteile. Die Abbildungen 22, 23, Tafel IV, lassen diesen Umstand gut erkennen.

b) Die Anhäufung der Hyperfragmente entsteht oft auf der Oberfläche einer farblosen oder blaugrünen, scheinbar aus hyaliner Grundsubstanz bestehenden, glänzenden oder kaum durchsichtigen, »trübfarbigen« Ausbuckelung. Das Wesen dieses eigenartigen Gebildes konnte bisher noch nicht geklärt werden. Möglicherweise ist es schleimiger Natur. Wir konnten auch seine sehr langsame Vermehrung und die auf solche Weise vor sich gehende Ausbreitung des Lagers beobachten. Es bot sich uns mehrmals Gelegenheit, ähnliche Bildungen bei der

---

Abb. 22. Ausbreitung eines besser entwickelten Zellenlagers mittels »pseudopodiumartigen« Fortsatzes. Der Fortsatz besteht aus bereits ganz entwickelten Granulen. 600 : 1, *23.* Ausbreitung eines entwickelten Zellenlagers mittels eines »pseudopodiumartigen« Fortsatzes. Die Granulen des Fortsatzes sind schon zu Zellen entwickelt. 430 : 1, *24.* Der durch eine Gerade abgetrennte Teil des vorigen Lagers (zwei Tage später). 1000 : 1

Züchtung von Mikroorganismen zu beobachten. So erschienen z. B. manchmal rings um die *Chlorella-*, *Pediastrum-* und *Chlamydomonas*-Zellen oder Zellgruppen hyalinartige, später sich verfärbende und grünlich granulierende Ausscheidungen (Sekrete), besonders dann, wenn die Züchtung auf Agar mit KNOPscher Lösung erfolgte. Eigentümlich ist nur, dass dies nicht immer der Fall war. VISCHER [17] stellte bei einer Art von *Protococcalen*, bei *Diplosphaera* fest, dass die Zelle, besonders auf Zucker-Agar, infolge der Verschleimung der Zellwand, schillernde Lager bilden kann. Natürlich ist es nicht erwiesen, ob wir auch im Falle von *Chlamydomonas* derselben Erscheinung gegenüberstehen.

Die aus hyaliner Grundsubstanz bestehenden Hügelchen sind auf den Abbildungen 20—21, Tafel III, gut zu sehen. Die auf der Oberfläche der Ausbuckelung sichtbaren, aus 6—7 granulenartigen Teilchen bestehenden Anhäufungen sind eigentlich kleine Häufchen von bereits in Entwicklung befindlichen Zellen. Jedes kleine Häufchen entstand vermutlich aus je einem Hyperfragment. Bei den auf Abbildung 20 unter der Bezeichnung »a« sichtbaren dunkleren Granulen von ungefähr 1 μ Durchmesser handelt es sich um in Entwicklung begriffene grüne Hyperfragmente.

Die langsame Ausbreitung des Lagers mittels lichtbrechender, »pseudopodium-artiger« Ausbuchtungen bzw. Fortsätze, ist eine aussergewöhnlich eigenartige Erscheinung (Textabbildung 4a). Zuerst erscheint am Rande des Lagers ein aus hyaliner Grundsubstanz bestehendes, fast cytoplasmaartiges Gebilde, das sich sehr langsam, nur nach einigen Tagen wahrnehmbar, aber ununterbrochen vorwärts bewegt und sich inzwischen offenbar auf irgendeine Weise vermehrt. In den meisten Fällen erscheint dieses Gebilde als ein Ausscheidungsprodukt der Zellen, doch wie auch immer sein Ursprung beschaffen sein mag, in der Ausbreitung des Lagers und der Bildung der neuen Zellen bzw. Granulen scheint es eine sehr wichtige Rolle zu spielen. Anfänglich erscheint es als kaum wahrnehmbares, an den Rand des Lagers sich anschmiegendes, schleimhüllenartiges Gebilde. Zu diesem Zeitpunkt glitzert es noch, so dass es ins Auge fällt. Nach einigen Tagen stösst es jedoch an gewissen Punkten vor, sein Glanz wird immer matter und es beginnt trübe zu werden. Kurz darauf erscheinen im Gebilde auch mikroskopisch wahrnehmbare feine Teilchen, die sich allmählich in blassgrüne, später grüne Granulen verwandeln. Manchmal zeigt sich im Laufe der Trübung eine blaugrüne oder gelbgrüne, zuweilen auch grünlich braune Färbung. Der wichtigste Umstand ist jedoch, dass die »Trübung« allmählich in Granulen übergeht, die sich dann in Zellen verwandeln.

Da dieser Vorgang vom Standpunkt der Entwicklung der Zellen überaus wichtig ist, wurde der Versuch gemacht, die als wichtigst beurteilten Phasen auch durch entsprechende Mikroaufnahmen zu veranschaulichen. Die Anfangsphase, das Erscheinen des aus hyaliner Grundsubstanz bestehenden Fortsatzes, des »Pseudopodiums«, wird durch Abbildung 21 illustriert. Das Erscheinen des Fortsatzes fällt in diesem Fall mit dem Entwicklungsanfang der Zellen zusammen.

Teil »b« des Lagers besteht, wie vorangehend bereits festgestellt, aus Anhäufungen der in Entwicklung begriffenen Zellchen. Teil »a« hingegen ist ein matt glänzender, eben in Trübung begriffener, »pseudopodium-artiger« Fortsatz, auf dessen Oberfläche bereits eine sehr feine, bräunlich grüne Granulierung zu erscheinen begann. Leider ging dieses Lager innerhalb einiger Tage zugrunde, so dass die weitere Entwicklung nicht beobachtet werden konnte. Der Verfall der Lager ist übrigens in diesem Anfangsstadium der Entwicklung eine allgemeine Erscheinung. Es ist nicht ausgeschlossen, dass dabei die häufige Untersuchung und auch die überaus hohe Intensität des Lichtes eine gewisse Rolle spielen. Die auf Agar-Platten vorgenommene Mikrophotographie erfordert nämlich die Anwendung sehr starker Lichtquellen. Zuweilen geht das vorwärtskriechende »Pseudopodium« bei der Ausbildung der Granulen zugrunde. Die nächste Phase wird in Mikroaufnahme 22, Tafel IV, in 600facher Vergrösserung veranschaulicht. Das kreisförmige und verhältnismässig umfangreiche Lager (Durchmesser ungefähr 170 μ) besteht aus zwei Teilen: aus dem die bereits fast völlig entwickelten Zellen enthaltenden grösseren Teil »b« und dem die Granulen in sich schliessenden Teil »a«. Der Teil »b« des Lagers besteht aus schon 8—10 μ langen und 5—6 μ breiten Zellen, in denen das am leichtesten erkennbare *Chlamydomonas*-Merkmal, der Pyrenoiden-Ring, meistens bereits in Erscheinung trat. Von dem aus Zellen bestehenden Teil des Lagers sonderte sich der aus Granulen bestehende Teil »a« durch eine fast gerade Linie ab. Die blassgrünen oder graugrünen Granulen des letztgenannten Teiles haben einen Durchmesser von 3—3,5 μ, d. h. sie befinden sich jenseits der oberen Massgrenze der Hyperfragmente und gelangten bereits in das Anfangsstadium der Zellwerdung. Die im Teil »a« in der Mitte des oberen Randes sichtbare Ausbuchtung ist der Anfang eines »pseudopodium-artigen« Fortsatzes, der die weitere Ausbreitung des jungen Lagers anzeigt. In diesem Stadium der Zellwerdung beobachteten wir auch häufig Lager von elliptischer Form und der »pseudopodium-artige« Fortsatz war auch hier durch eine ziemlich scharfe Grenzlinie von dem bereits aus Zellen bestehenden Teil des Lagers getrennt. Die Ausbreitung der Lager mit »Pseudopodium« war bei einzelnen Kulturen eine sehr häufige Erscheinung. Die mit Fortsätzen sich ausbreitenden Lager kamen nicht nur nebeneinander vor, sondern einzelne Lager begannen sich gleichzeitig mit zwei entwickelten „Pseudopodien" oder mit mehreren weniger entwickelten Fortsätzen auszubreiten.

Schliesslich können wir als dritte Phase der Entwicklung den Zustand bezeichnen, in dem auch der »pseudopodium-artig« sich entwickelnde jüngere Teil des Lagers den Grad der Zellwerdung erreicht. Diesen Zustand zeigen uns die Aufnahmen 23 und 24. Mikrophoto 23 stellt ein sehr gut entwickeltes, verhältnismässig umfangreiches (ungefähr 230 μ langes und 150 μ breites) elliptisches Lager dar. Der ältere und grössere Teil »b« besteht aus 12—14 μ langen und 6—7 μ breiten Zellen, in denen das charakteristische *Chlamydomonas*-

Merkmal, das ringartige Pyrenoid, bereits in völlig entwickelter Form anzutreffen ist. Die Mitte dieses Teiles des Lagers wölbt sich deutlich wahrnehmbar. Teil »a« des Lagers, also der ehemalige, aus hyaliner Grundsubstanz bestehende pseudopodiumartige Fortsatz, ist gleichfalls durch eine ziemlich scharfe Grenzlinie von dem älteren und besser entwickelten Teil des Lagers getrennt und besteht ebenfalls schon aus jungen Zellen. Die grünen kugelförmigen Gebilde haben einen Durchmesser von 4—5, manchmal auch 6—7 μ, ihre innere Differenzierung ist bereits ziemlich deutlich zu erkennen, sie können also schon als eigentliche Zellen betrachtet werden. Der aus dem pseudopodiumartigen Fortsatz entstandene jüngere Lagerteil ist in der Richtung der Ausbreitung flach, d. h. der Vorderteil ist schon breiter, als der an den älteren Lagerteil sich anschliessende Grundteil. Auch diese Tatsache lässt darauf schliessen, dass hier eine ständige, langsame Ausbreitung vor sich geht, da die pseudopodiumartigen Fortsätze im Anfangsstadium ihres Erscheinens, bevor noch die Granulation erfolgt, im allgemeinen spitz auslaufen (z. B. Teil »a« der Abbildung 21, Tafel III).

Auf Abbildung 23 ist der Teil des Lagers, von dem zwei Tage später die in Abbildung 24 gezeigte Aufnahme gemacht wurde, mit einer schwarzen Linie umgrenzt. In diesem Fall sind in den Zellen von Teil »b« die bezeichnenden Pyrenoid-Ringe bereits in 1000facher Vergrösserung gut zu entnehmen. In den noch in Entwicklung begriffenen Zellen von Teil »a« (z. B. in der bezeichneten Zelle) sind die Pyrenoiden noch schollenartig und treten im Zentrum der Zellen als dunklerer Fleck in Erscheinung.

In den vorangehenden Ausführungen wurde der Versuch gemacht, die Phasen der mit pseudopodiumartigen Fortsätzen vor sich gehenden Ausbreitung der *Chlamydomonas*-Lager zu beschreiben. Die Darstellung dieser Einzelerscheinungen sagt uns jedoch nur recht wenig über das Wesen dieser Vorgänge selbst. Die Untersuchung dieser Vorgänge erheischt also im weiteren Verlauf unsere ganz besondere Aufmerksamkeit, da hier vielleicht eine neue Form der Vermehrung bzw. der Entstehung von Zellen vorliegt. Der Umstand, dass die auf den festen Nährboden angebrachten Zellen oder Lager mit einer hyalinen glänzenden »schleimartigen« Substanz umgeben sind, kann nicht als besondere Erscheinung gewertet werden. Wir können darin den Einfluss des neuen Milieus erblicken. Hingegen muss uns der Umstand, dass diese anfänglich hyalinartige »schleimige« Substanz granuliert, sich verfärbt und dass schliesslich in ihr Zellen entstehen, veranlassen, diese Vorgänge eingehender zu untersuchen. Es hat den Anschein, als ob hier eine »Ausströmung« gewisser Zellsubstanzen vor sich ginge. Die Feststellung des Wesens dieser Erscheinungen erfordert schon deshalb weitere Untersuchungen, da — wie bereits erwähnt — ähnliche Erscheinungen auch im Falle entwickelter Zellen beobachtet werden konnten. Die Fortsetzung dieser Untersuchungen ist auch deshalb nötig, weil die »Ausbreitung mit Pseudopodien« bei weitem nicht in allen Fällen zu beobachten ist. Gewöhnlich zeigte sie sich nur nach einer auf Agar erfolgten Anbringung

der zerfallenden Substanz oder der länger ohne Überimpfung gezüchteten Hyperfragmente.

Die Bildung der Lager aus Zellen mit *Chlamydomonas*-Charakter geht manchmal ohne Aussendung von »Pseudopodien« oder Lagerfortsätzen vor sich. Abbildung 25 (Textabbildung 4b) stellt einen Teil eines solchen zelligen »Riesenlagers« dar. Der *Chlamydomonas*-Charakter der Randzellen ist gut zu erkennen.

2. Im Falle der aus Klon-gezüchteten Hyperfragmenten entstehenden Lager konnten die oben beschriebenen Erscheinungen im allgemeinen nicht beobachtet werden (Textabbildung 5). Die auf Agar-Platten angebrachten Hyperfragmente entwickelten sich nach einer kurzen Vermehrungsperiode zu Zellen. Demzufolge blieben die Lager im allgemeinen klein und enthielten nur wenige Zellen. Solche zeigt uns Abbildung 19, Tafel III. In den 4—5 μ grossen kugelförmigen Gebilden findet sich bereits ein schollenartiges Pyrenoid vor, d. h. sie sind bereits im Zustand der Zellwerdung. Ein Zellkern konnte noch nicht festgestellt werden.

Während der Ausbildung der Zellen können auch Rückfälle in der Entwicklung eintreten. Wie bereits früher erwähnt, kann im Anfangsstadium ein Teil des Lagers, häufig aber auch das ganze Lager, zugrunde gehen. Im späteren Verlauf hingegen ist oft ein neuerlicher Zerfall der Zellen zu beobachten. Mikroaufnahme 26 stammt von einem Lager, in dem, wie bereits erwähnt, alle Zellen gleichmässig eine wiederholte Hyperfragmentation erlitten. Die Zellen des aus Klon-gezüchteten Hyperfragmenten entstandenen Lagers befanden sich in gleichem physiologischen Zustand.

III. Die Bildung der Zellen mit Protococcales-Charakter

Aus obigen Ausführungen geht hervor, dass sich die auf Agar-Platten angebrachten Hyperfragmente mehr oder minder lange vermehren und sich dann zu den zwischen dem *Chlamydomonas*- und *Protococcales*-Typus stehenden, jedoch mehr an *Chlamydomonas* erinnernden Zellen entwickeln. An *Chlamydomonas* erinnern die elliptische oder ovale Form der Zelle, die Masse derselben, am meisten jedoch das grosse ringförmige Pyrenoid, das in so entwickelter Form bei den *Protococcales*-Typen nicht anzutreffen ist. Scheinbar blieben vom *Chlamydomonas*-Charakter nur die Merkmale erhalten, die durch die ortgebundene Lebensweise am wenigsten betroffen wurden. Hingegen reduzierten sich die auf der Vorderseite der Zelle befindlichen und vor allem mit der Bewegung zusammenhängenden Organelle: die Flagellen, das pulsierende Vacuolen-System und das Stigma. Aus dem gleichzeitigen gemeinsamen Verschwinden dieser Organe kann gefolgert werden, dass zwischen ihnen irgendeine Korrelation besteht und zu ihrer Entwicklung die Bedingungen einer beweglichen

Tafel V

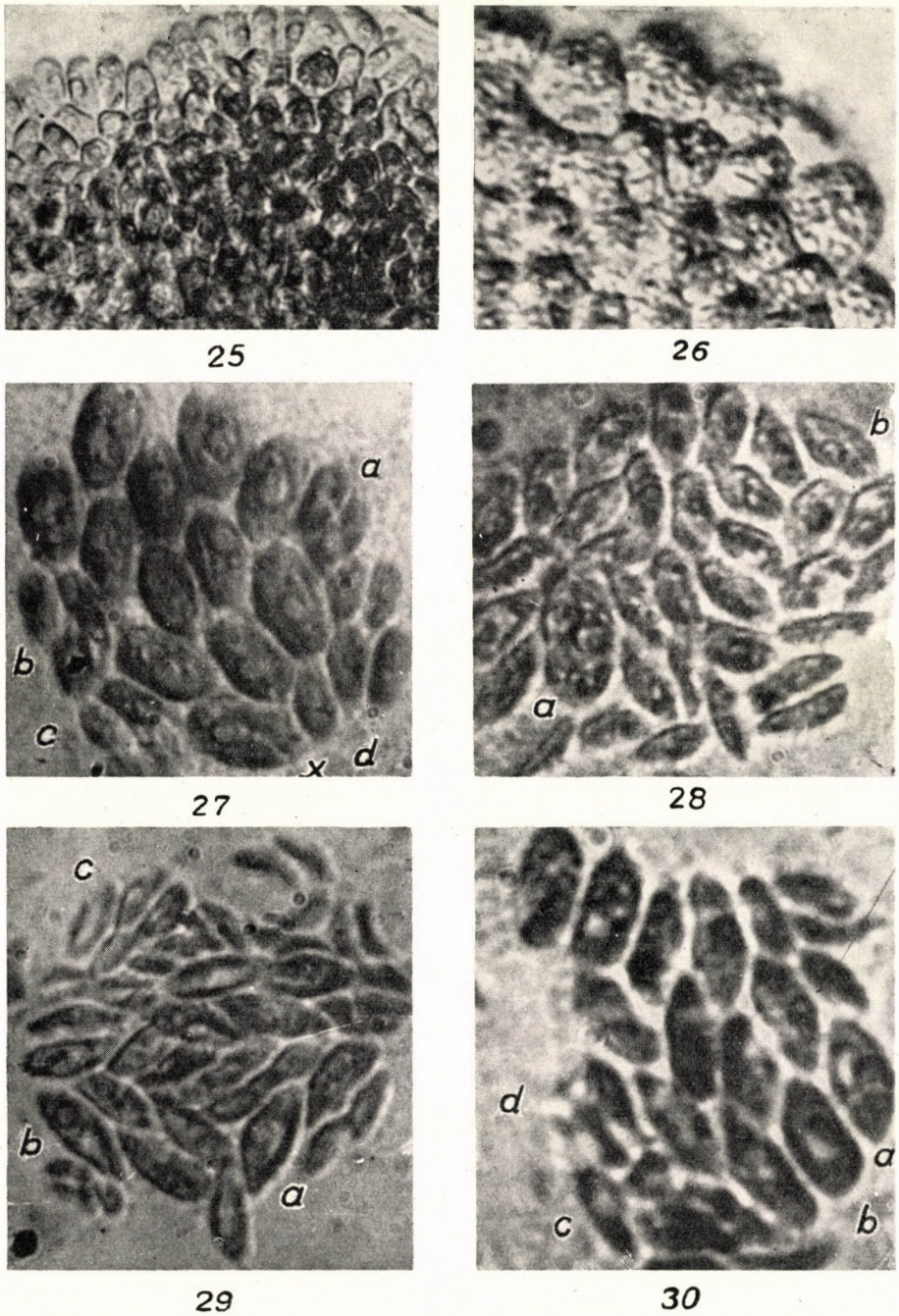


Abb. 25. Teil eines »Riesenlagers« aus entwickelten *Chlamydomonas*-artigen Zellen. 420 : 1
26. Rückfall in der Entwicklung mit wiederholter vollständiger Hyperfragmentation. 900 : 1

Lebensform nötig sind. Mit der einfachen Feststellung, dass Umwelt bzw. Notwendigkeit die nötigen Organe »hervorbringen«, lässt sich dieses Problem nicht lösen, da einerseits die in die Nährflüssigkeit gelegten Zellen ihre verlorenen Organelle nicht wiedererlangten, anderseits Hyperfragmente in einer Nährlösungs-Umwelt überhaupt nicht gezüchtet werden konnten.

Am interessantesten waren jedoch die Vorgänge, die sich nach der Umwandlung zu Zellen der aus der Klon-Kultur stammenden Hyperfragmente abspielten. Die noch *Chlamydomonas*-Charakter aufweisenden Zellen zerfielen mit einer gewissen Progressivität zu Zellen mit *Protococcales*-Charakter (Textabbildung 6). Wir versuchen nun aus dem uns zur Verfügung stehenden reichhaltigen Untersuchungsmaterial die bezeichnendsten Phasen auf einigen Mikroaufnahmen zu demonstrieren. Abbildung 27 zeigt ein aus verhältnismässig wenigen Zellen bestehendes Lager in 1000facher Vergrösserung. Hier ist der *Chlamydomonas*-Charakter noch auffallend. Die Fragmentation der Randzellen des Lagers hat bereits begonnen. Die Zellen »a—b—c« teilen sich in drei Fragmente, während bei Zelle »d« eine vierfache Teilung stattfindet. Die Zelle »x« beginnt sich in Längsrichtung zu teilen. Ein weiter fortgeschrittenes Stadium des Fragmentations-Zerfalls veranschaulicht Abbildung 28. Unversehrt ist nur mehr die Zelle »a«, die auch den *Chlamydomonas*-Charakter bewahrt hat, während die übrigen Zellen Teilungsprodukte sind. Diese letzteren spitzen sich zu und verlieren endgültig den *Chlamydomonas*-Charakter. Zelle „b" beginnt sich — wie deutlich sichtbar — in Längsrichtung zu teilen. Scheinbar spielen im Laufe der Fragmentation, bei der Formausbildung der Zellen, auch die Raumverhältnisse eine gewisse Rolle.

Bei der Umwandlung der aus Teilung der Zellen mit *Chlamydomonas*-Charakter stammenden und in der Regel sich zuspitzenden Zellen zu Zellen mit *Protococcales*-Charakter spielt auch die sog. Vertiefungs-Fragmentation eine wichtige Rolle [9]. Abbildungen 29 und 30 stellen diese Anfangsphase dar. Bei beiden Lagern ist die ungefähr in der Mitte erfolgte Vertiefung klar zu sehen. Zuerst erscheint ein heller Fleck (29a—b, 30 a—b), der sich polwärts fortsetzt und die Zelle gewöhnlich in zwei ungleich grosse Teile zerschneidet (29c, 30c—d). Das grössere Fragment zerfällt dann weiter. Bei den einzelnen Zellen beider Lager ist das für *Chlamydomonas* bezeichnende Pyrenoid noch immer zu beobachten.

Die weitere Teilung dieser durch Fragmentation entstandenen, Übergangscharakter aufweisenden Zellen geht mit einer immer typischer werdenden Vertiefungs-Fragmentation vor sich und als Folge davon entwickeln sich auch

Abb. 27—30. Fragmentation der auf Agar-Platten aus Hyperfragmenten entstandenen Zellen zu Zellen mit *Protococcales*-Charakter. *27.* Kleines Lager von Zellen mit *Chlamydomonas*-Charakter. 1000 : 1. *28.* Zellen eines *Chlamydomonas*-Lagers nach Fragmentations-Teilung. 1080 : 1. *29.* Beginn der Vertiefungs-Fragmentation bei atypischen Zellen. 900 : 1. *30.* Zerbröckelung durch Vertiefungs-Fragmentation. 1080 : 1

Tafel VI

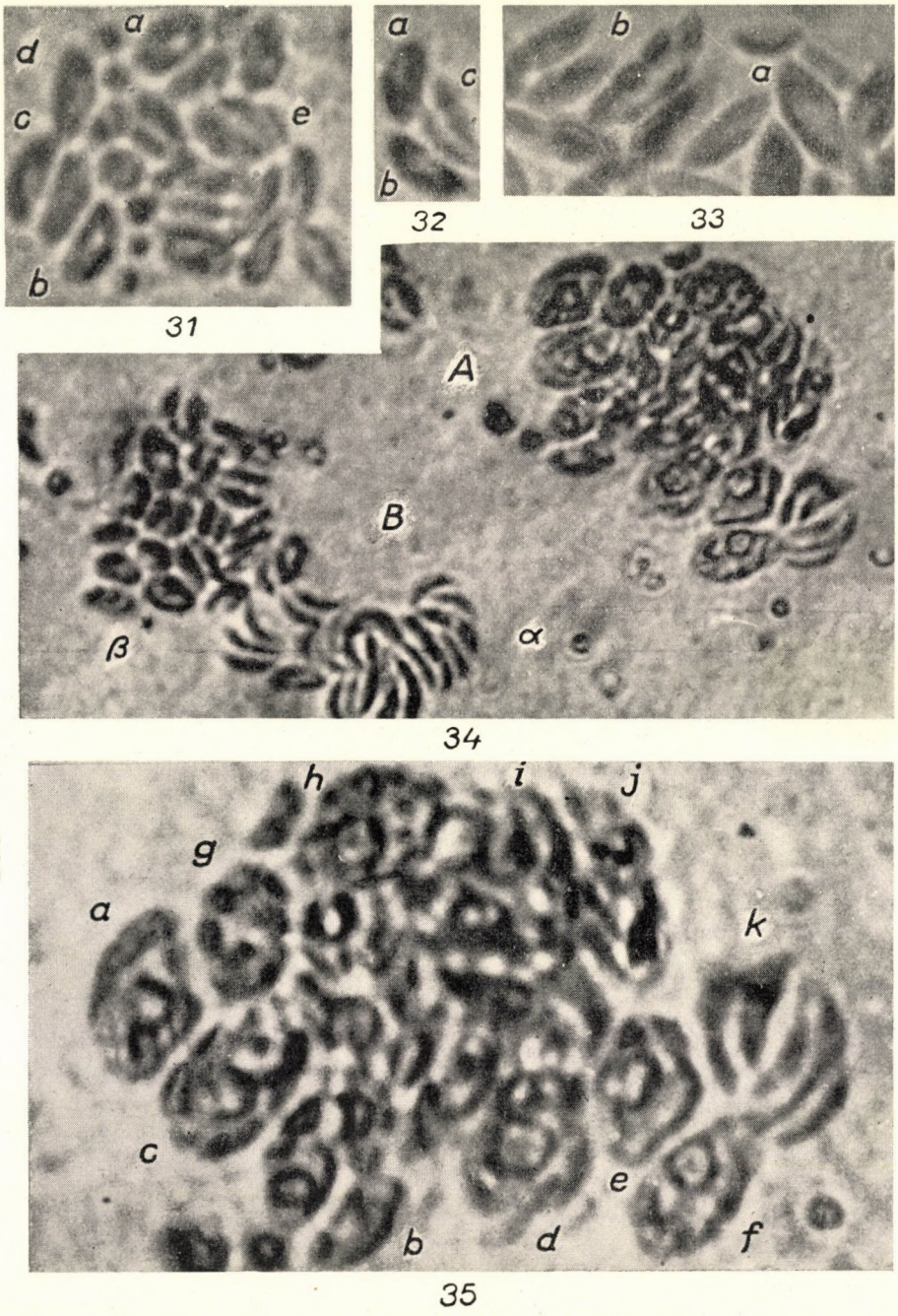


Abb. 31. Eine zum zweiten Male auftretende Vertiefungs-Fragmentation der Zellen. 1440 : 1
32. Die drei Hauptphasen der Vertiefungs-Fragmentation einer Zelle mit *Dactylococcus*—Cha-

die Produkte der Teilung mehr und mehr zu Zellen mit *Protococcales*-Charakter. Auf Abbildung 31 sind die Zellen »a—b« eingedrückt und löcherig, bei Zelle »c« ist die Vertiefung am Saum des Lagers ausgerissen, bei Zelle »d« zerbröckelt diese parallel mit der Durchlöcherung in mehrere Teile, bei Zelle »e« hat sich der Zerfall in drei ungleich grosse Teile bereits vollzogen und der grössere untere Teil ist eben im Begriffe, sich in Querrichtung abermals zu teilen. Auf diese Weise entstehen die kurzen spindelförmigen und spitz endenden Zellen mit sog. *Dactylococcus*-Charakter (PASCHER: *Keratococcus)*, die im weiteren Verlauf auf recht verschiedene Weise zerfallen und variieren können. Abbildung 32 zeigt uns drei Zellen die bereits ausgesprochenen *Dactylococcus*-Charakter aufweisen. Jede der drei Zellen hat eine andere Hauptphase der Vertiefungs-Fragmentation: Zelle »a« ist eben im Begriffe, sich zu durchlöchern, bei Zelle »b« setzt sich die Durchspaltung den beiden Polen zu fort, während am unteren Teil der Zelle die Spalte bereits entstanden ist, Zelle »c« hingegen zeigt den endgültigen Zustand der Zweispaltung. Bei der letzten Zelle zerfielen die einzelnen Hälften bereits weiter. Aus Mikrophoto 33 geht hervor, dass die Zellen unmittelbar auch in kugelförmige Teile zerfallen können. Zelle »a« und ihre unmittelbaren Nachbarn befinden sich am Anfang der Vertiefungs-Fragmentation. Auf der oberen Seite der Zelle »b« entwickelten sich vier kugelartige Fragmente, während auf der anderen Seite zwei mehr längliche Fragmente im Entstehen begriffen sind. Mikrophoto 34 stellt einen grösseren Teil der Oberfläche der Agar-Platte in 720facher Vergrösserung dar. Das Lager »A« veranschaulicht das endgültige Verschwinden des *Chlamydomonas*-Charakters, während Lager »B« den weiteren Zerfall der bereits entstandenen Zellen mit *Protococcales*-Charakter zeigt. Bei Umwandlung der Zellen waren ähnliche Rhythmus-Unterschiede sehr häufig zu beobachten. Mikrophoto 35 stellt das Lager »A« in 1440facher Vergrösserung dar. Diese Aufnahme verdient unser besonderes Interesse, da hier die einzelnen Phasen der Fragmentation bei demselben Lager der Reihe nach beobachtet werden können. Die linksseitige Zelle ist bereits ein wenig deformiert, der grosse Pyrenoidenring lässt jedoch noch untrüglich den *Chlamydomonas*-Charakter erkennen. Zelle »b« ist der Länge nach entzweigeteilt, nur das Pyrenoid ihrer linksseitigen Tochterzelle ist sichtbar. Die Zellen »c—f« sind noch ganz, auch ihr Pyrenoid ist vorhanden, doch kann der Zerfall in kleinere kugelförmige Körperchen bereits beobachtet werden. Zelle »g« ist bereits zur Gänze in ovale Zellen zerfallen (Autospora). Bei »h« haben sich schon zwei Kugeln abgelöst. Die Ablösungsstelle ist an der Mutterzelle noch wahrzunehmen. Bei den Zellen „i—k" bringt der Zerfall gewölbte Zellen mit *Ankistrodesmus*-Charakter hervor. Bei den Zellen »i—j« ist diese Umwandlung

rakter. 1440 : 1. *33.* Vertiefungs-Fragmentation von Zellen mit *Dactylococcus*-Charakter. 1440 : 1. *34.* Fragmentation von Zellen mit *Chlamydomonas*-Charakter zu Zellen mit *Protococcales*-Charakter. Die einzelnen Phasen können innerhalb ein und desselben Lagers beobachtet werden. 720 : 1. *35.* Lagerteil »A« der vorigen Aufnahme. 1440 : 1

noch im Anfangsstadium, es sind vorerst nur die spitzen Enden der Fragmente gut zu erkennen, hingegen ist der Zerfall der Zelle »k« in Objekte mit *Ankistrodesmus*-Charakter bereits völlig beendet. Auf der linken Seite haben sich zwei grössere, auf der rechten drei kleinere Fragmente gebildet. Diese zerfallen schnittartig weiter. Der schnittartige Zerfall tritt auf Abbildung 34, bei Teil »α« des Lagers »B« noch auffallender in Erscheinung, während die vorangehende Vertiefungs-Fragmentation bei den Zellen des Teiles »β« zu beobachten ist.

Ausser den gezeigten Haupttypen konnten auch noch zahlreiche andere, ganz besondere Varianten der Bildung von Zellen mit *Protococcales*-Charakter beobachtet werden. Es kam auch mehrmals vor, dass die noch durch Vertiefungs-Fragmentation der Zellen mit *Chlymadomonas*-Charakter entstandenen Zellen mit *Protococcales*-Charakter weiter zu Zellen mit ausgesprochenem *Ankistrodesmus*-Charakter zerfielen und zwar innerhalb je eines ausgedehnteren Lagers. Neben der Entwicklung der Zellen mit *Dactylococcus*-Charakter entstanden ab und zu auch noch Zellen mit kürzerem und stumpfem Ende, die bereits eine grosse Ähnlichkeit mit den Zellen einzelner *Scenedesmus*-Typen aufwiesen. Die grosse Vielfältigkeit der Formen beansprucht sowohl vom biologischen, als auch vom pflanzensystematischen Standpunkt aus besondere Aufmerksamkeit und weitere Untersuchungen.

Unser Dank gebührt B. LOVAS und M. MERSVA für die liebenswürdige Herstellung der Aufnahmen und die freundliche Präparierung im Laufe der elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

LITERATUR

1. *Аристовский, С. М., Минкевич, И. Е., Фрид, С. М.,* (1950) Медицинская микробиология. Медгиз, Москва

2. BRUNNTHALER, J. (1915) Protococcales. In PASCHER, A. *Süsswasserflora.* Jena. **5,** 52—205.

3. CLAUDE, A. (1954) Cell morphology and the organization of enzymatic systems in cytoplasm. *Proc. Roy. Soc. London B.* **207,** 177—186.

4. GEITLER, L., PASCHER, A. (1925) Cyanochlorodinae-Chlorobacteriaceae. In PASCHER, A. *Süsswasserflora,* **12,** 451—463.

5. HILL, R., NORTHCOT, D. H., DAVENPORT, H. E., (1953) Active chloroplast preparations from *Chlorella pyrenoidosa. Nature,* **172,** 948—949.

6. JUHÁSZ, I. (1954) A mikroorganizmusok változékonysága különös tekintettel a baktériumok szűrhető formáira. On the variability of microorganisms with special reference to the filtrable forms of bacteria. *Biol. Közl.,* **2,** 51—67. (Ungarisch, englische Zusammenfassung.)

7. JUHÁSZ, I., VADÁSZ, J. (1955) Regeneration of the filtrable forms of Salmonella enterediti in media containing blood plasma (Fibrin Structure). *Nature,* **176,** 208—209.

8. KISS, I. (1952) Tovább élő plazmarészecskék képződése a Scenedesmus sejtek hyperfragmentatiós szétesése révén. Die Bildung fortlebender Plasmateilchen infolge Hyperfragmentations-Zerfalls von Scenedesmus-Zellen. *Ann. Biol. Univ. Hung.,* **2,** 429—440. (Ungarisch, deutsche Zusammenfassung.)

9. KISS, I. (1954) Az amitotikus sejtosztódás új formájáról. Eine neue Form der amitotischen Zellteilung. *Biol. Közl.,* **2,** 83—92. (Ungarisch, deutsche Zusammenfassung.)

10. KUTHY, S., JUHÁSZ, B. (1953) Biokémia. Biochemie. Budapest, Mezőgazdasági Kiadó. (Nur ungarisch.)

11. *Лепешинская, О. Б.* (1950) Происхождение клеток из живого вещества и роль живого вещества в организме. Изд. Акад. Мед. Наук СССР, Москва.

12. PASCHER, A. (1927) Volvocales. In PASCHER, A. *Süsswasserflora.* Jena. **4.** 20—506.

13. PUNETT, T., FABIYI, A. (1953) Production of oxygen from chloroplast preparation. Nature, **172,** 947—948.

14. SCHANDERL, H. (1951) Über die natürliche und künstliche Verwandlung von Schimmelpilzen und Hefen in Bakterien. *Mikroskopie,* **6,** 146—157.

15. SCHANDERL, H. (1953) Methoden zur Auslösung spontaner Bakterienentwicklung in normalen Pflanzengeweben bzw. Pflanzenzellen, *Ber. Deutsch. Bot. Ges.,* **66,** 79—88.

16. SINKOVICS, J. (1954) Az élet sejtelőtti formái a mikrobiológiában. Precellular forms of life in the microbiology. *Biol. Közl.,* **2,** 69—81. (Ungarisch, englische Zusammenfassung.)

17. VISCHER, W. (1953) Mutationen bei der Algengattung *Diplosphaera. Arch. Julius Klaus-Stift.,* **18,** 287—294.

ПРЕОБРАЗОВАНИЕ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ЧАСТИЦ РАСТИТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В КЛЕТКИ

Автор наблюдал у нескольких растительных микроорганизмов при неблагоприятных условиях распад клеток на зеленые тельца на так называемые гиперфрагменты размером в 1—2 ц, которые сохраняют свою жизнеспособность и могут развиваться в клетки. Он подробно занимается с тельцами одноклеточного растения *Chlamydomonas.* В процессе развития гиперфрагментов в клетки происходят изменения повидимому значительного размера. Клетки характера *Chlamydomonas* оформлялись в процессе так называемой перетяжной фрагментации в клетки характера *Protococcales.* Образование и регенерацию гиперфрагментов можно сравнивать с подобными процессами, известными у бактерий.

THE DEVELOPMENT INTO CELLS OF THE PLASMA PARTICLES OF PLANT MICROORGANISMS

The author has observed in several plant microorganisms that under unfavourable conditions the cells disintegrate into 1—2 micron large green coloured corpuscles, into so-called hyperfragments, which remain viable also further on and may develop into cells. He deals in detail with the corpuscles of the unicellular plant *Chlamydomonas.* During the development of the hyperfragments into cells, changes occurred which appeared to be of a considerable extent. In the course of the indented fragmentation the cells of the *Chlamydomonas*-type assumed the shape of cells of the *Protococcales* type. The formation and regeneration of hyperfragments may be compared with similar processes known in bacteria.

ISTVÁN KISS, Szeged, Pädagogische Hochschule, Lehrstuhl für Botanik. Ungarn.

THE EXAMINATION OF THE FEEDING BIOLOGY AND THE HUMIFICATIVE FUNCTION OF DIPLOPODA AND ISOPODA

G. GERE

INSTITUTE OF SYSTEMATIC ZOOLOGY, EÖTVÖS LORÁND UNIVERSITY, BUDAPEST (DIRECTOR : E. DUDICH)

(Received April 26, 1955)

Summary

Author discusses in his paper the results of his research in the feeding biology and the humificative function of the detritophagous diplopodan and isopodan species in the litter of forests. The results of this research can be shortly summed up as follows.

The increase of the weight of the animals in experimental conditions (litter leaves of 16—22 °C, containing 50% of water) is very slow, and never reaches the daily 0,25%.

The animals consumed an amount of litter leaves that corresponded to the 0,5—4% of their live weight (litter leaves in abs. dry weight). This amount is smaller than those given in the literature.

In identical conditions smaller animals consumed relatively more food than the larger ones. On the basis of the Law of Surface, the quotient resulting from the weight of the food consumed daily by the animals, and from the cube root of the square of the weight of the animals, that is, the VAN DER DRIFT constant, is an approximately constant figure, independent of the size of the animals.

The value of the VAN DER DRIFT constant is, in identical conditions, independent not only of the size of the animals but also of its species. Accordingly, it can be deduced that the type of metabolism of detritophagous species of the same habit is essentially agreeing. This circumstance offers some possibility — in the cognizance of the feeding biology of a detritophagous artropodan species of a given forest — to make deductions concerning the litter-decomposing function of other species of similar habits.

Concurrently with the rise in temperature, the amount of food consumed will also grow rapidly. The optimum lies probably some few grades above 20 °C.

With regard to their metabolism, the species examined show a seasonal cycle, insofar, as their metabolism is more intensive in the spring as in the autumn.

The amount of food consumption is also dependent on the state of decomposition of the litter leaves.

A relatively small proportion of the food consumed (0—7%) is being built into the organism of the animal.

The rate of the utilization of the food material is largely dependent on its state. When the animals were fed with oaken litter leaves taken from layer F_1, the weight of the excrement reached 87,63—96,23% of the weight of the food consumed, whilst the amount of the material burnt oscillated between 0—9,14%. On the other hand, when they were fed with litter leaves of layer F_X, the amount of excrement varied only between 79,72—85,04%, and the waste of material reached 9,44—20,54%. Consequently litter leaves from layer F_1 are digested in a lesser rate than those taken from layer F_X. From the point of view of humification this means that, whereas the litter of layer F_1 when passing through the digestive tracts is being broken up — so to say — mechanically only, the leaves originating from layer F_X undergo considerable chemical decomposition during the same period.

Introduction

The literature is uniform in attributing a great importance to the litter-decomposing function of the detritophagous Arthropoda living in the litter stratum of the forest [6, 7, 11, 13, 15, 16]. The relevant views of some authors

are, however, rather different. This should be ascribed primarily to our lack of information concerning the life and metabolism of the animals. The elucidation of this important problem in the productive biology of the forest requires a number of further experiments to be executed according to many new points of view. Their execution and correct evaluation is, however, rendered rather difficult; indeed, well-nigh impossible by a number of special circumstances. In fact the majority of the animals cannot, or can hardly be kept in laboratory conditions, and great many factors must be kept in mind in the course of the evaluation of the results. The metabolism of these animals is influenced by the quality and humidity content of the food, by temperature, season, and by their age not to mention a presumably considerable number of yet unknown factors. Even if all these are kept in mind, the task of correctly applying the data, obtained by measurements, to the natural habitat of the animals still remains unsolved.

The aim of my work was to examine in different laboratory conditions the total food circulation of the most important detritophagous arthropodan species of the macrofauna in the forest floor, thereby to contribute to our knowledge of the life and metabolism of these animals, and to evaluate these data with an eye on the above mentioned difficulties — for further clarification of the humificative function of the animals. Another circumstance that prompted me to undertake this task was — as already pointed out above — the many contradictory instances in the literature.

Material and methods

I have selected for my experiments the following three species: *Glomeris hexasticha* BRANDT, *Chromatojulus projectus* VERHOEFF, *Protracheoniscus politus* C. L. KOCH. These diplopodous, that is, isopodous species, as shown by the zoocoenological surveys of BALOGH and LOKSA, generally dominate in our widely ranging Querceto-Potentilletum albae and Querceto-Lithospermetum plant associations, but will frequently occur even elsewhere.

The keeping of the above species in laboratory conditions is not an utterly insolvable task: they may be kept so even for long periods if a suitable litter and soil substratum is secured. Nevertheless the conditions necessarily imposed by experiments, such as the relatively meagre amount of litter and the lack at natural soil substratum, will limit their duration for after a certain time the animals will become ill and show the symptoms of decreasing metabolism. I tried, of course, to make the utmost use of the maximal possibilities: my longest experiment lasted 59 days.

I kept the animals in unglazed earthen pots covered by a sheet of glass, even partly darkened by a bit of cardboard. The bottom of the pots were sunk into the wet sand. According to my experiences, this method is more suitable for the breeding of the animals than the glass dishes, since unglazed earthen vessels will, on the one hand, better guarantee aerial circulation whilst, on the other hand, they will absorb water so that the regulation of the humidity content of the food material can be accomplished by the suitable wetting of the sand, which will, again, prevent the detrimental accumulation of condense water. No sand was put on the bottom of the pots, as it would have hindered the collecting of the excrement, and also because it has proved to have no observable advantageous effect on the life functions of the animals.

I have recorded the weight of the animals both before and after the experiments; the amount of the food material consumed, and the weight of the excrement produced. In order to assure an empty digestive tract, feeding was suspended for 48 hours in both cases and the animals were weighed after fasting. The concurrent establishment of the water content of animals of a size corresponding to the size of those used in the experiments enabled us to convert the weight of the test animals into absolute dry weight.

The animals were fed with oaken litter leaves from a Querceto-Potentilletum albae association. The leaves were selected so as to represent two different phases of decomposition. In some of the experiments, I applied opaque leaves taken from layer F_1, whilst in some others, faded and translucent ones taken from layer F_X. Whereas the former had a high content of plasmatic remains, the latter consisted of leaves in the state of a more advanced decomposition, in their bulk consisting of the remnants of cell walls. In every case, I endeavoured to use homogeneous leaf particles which I weighed after a drying process of 2 hours on 104 °C, that is, in an absolute dry state. The weighing of the litter that remained after the experiments was carried out in the same way.

During experiments I kept, in another pot under the same conditions, litter leaves similar to those used for breeding but without any animals feeding on them, to be able to register the changes in their weight brought about by bacteria and fungi. The weight of the litter leaves kept without animals feeding on them showed a considerable decreased. Accordingly, I deduced this loss of weight from the measured amount of litter consumed by the animals and gave this correctional value in the table.

In all experiments I kept the sand, into which the pots were sunk, wet, to ensure a 50% of water content in the food.

The accumulated excrement was removed from the pots once daily, and stored dry, to prevent its secondary decomposition. The amount of excrement that accumulated during the 48 hours of fasting following the experiments was added to the excrement earlier removed.

The test animals were kept on uneven temperature showing daily fluctuations as in the more natural field conditions. The temperature values show the daily average during the experiments; allowing a maximum deviation at $\pm$1—1,5 °C according to the different parts of the day.

In my experiments I tried to find answers to the following questions:

1. What is the rate of the increase in weight of the growing animals?

2. What is the amount of food consumed by the animals in certain definite conditions?

3. Does the Law of Surface apply to the quantitative relations of food consumption of small and large individuals, and is there any similarity in the food material consumption of the examined detritophagous species?

4. What is the influence of the quality of food and of the temperature on the feeding of the animals?

5. Is there any seasonal cycle in the metabolism of the animals examined?

6. What is the percentage of the food material the animals build into their organisms, what is the percentage discharged in the form of excrement, and what is the rate of oxydation?

7. What is in the light of the answers to the above questions, the function of the animals in the humification of forest litter?

Results

The results of all my measurements are summed up in Table 1. Though the number of animals was different in each experiment I have for the sake of easier comparison, calculated the data of weights for one animal in every case. In Experiment 6, I measured the consumption of food and the changes in the weight of the animals in two instances. These data are recorded under 6/1 and 6/2. The excrement accumulated during experiments was measured once only, after the conclusion of the test. The two parts of the experiments were conducted on different temperatures. The absolute dry weights of the animals given for the beginning of the experiments are, naturally, computed

Table 1

Number	Species	Litter layer used for feeding	Time of experiments (season)	Duration of experiments in days	Temperature mean °C	Number of test animals	Live weight of 1 animal at the beginning (mg)	Live weight of 1 animal at the end (mg)	Abs. dry weight of 1 animal at the beginning (mg)	Abs. dry weight of 1 animal at the end (mg)	Daily increase in weight of 1 animal in live weight (mg)	Daily increase in weight of 1 animal in abs. dry weight (mg)	Number of moulted animals	Total weight of moulted chitinous exuviae (mg)	Daily consumption of litter by 1 animal (in abs. dry weight) (mg)	Daily excrement of 1 animal (in abs. dry weight) (mg)
							of the experiment									
1.	juv. *Glomeris*	F_1	autumn	20	21,1	10	53,72	53,91	15,93	15,98	0,0097	0,003	3	8,3	1,67	1,57
2.	juv. *Glomeris*	F_1	autumn	20	21,1	10	50,28	50,90	14,90	15,09	0,031	0,009	2	5,3	1,37	1,29
3.	juv. *Glomeris*	F_X	autumn	59	17,5	10	53,91	55,46	15,98	16,44	0,026	0,008	4	14,9	0,45	0,37
4.	ad. *Glomeris*	F_1	autumn	14	20,8	10	215,13	216,67	63,78	64,24	0,110	0,033	1	25,3	4,10	3,94
5.	ad. *Glomeris*	F_1	autumn	14	20,8	10	209,76	211,45	62,19	62,69	0,121	0,036	—	—	3,72	3,58
6.	ad. *Glomeris*	F_1	autumn	45	19,5	5	213,07	205,48	63,17	60,92	—0,170	—0,050	3	45,3	2,94	2,75
6/1.	ad. *Glomeris*	F_1	autumn	30	21,0	5	213,07	202,22	63,17	59,95	—0,360	—0,107	3	45,3	3,32	—
6/2.	ad. *Glomeris*	F_1	autumn	15	16,7	5	202,22	205,48	59,95	60,92	0,216	0,060	—	—	2,19	—
7.	ad. *Glomeris*	F_1	autumn	30	21,0	5	198,64	200,13	58,89	59,33	0,049	0,015	1	17,0	4,07	3,87
8.	ad. *Glomeris*	F_1	spring	11	16,1	3	161,39	165,51	47,85	49,07	0,374	0,111	—	—	2,22	2,12
9.	juv. *Chromatojulus*	F_1	autumn	11	21,8	7	125,08	128,02	50,97	52,17	0,267	0,109	—	—	3,38	2,96
10.	juv. *Chromatojulus*	F_X	autumn	43	17,4	10	110,34	116,98	44,96	47,67	0,155	0,063	—	—	1,02	0,82
11.	ad. *Chromatojulus*	F_1	autumn	41	18,4	5	244,10	227,95	101,86	95,09	—0,390	—0,160	—	—	2,37	2,25
12.	ad. *Chromatojulus*	F_X	autumn	43	17,4	1	338,37	349,42	141,20	145,81	0,257	0,107	—	—	1,45	1,15
13.	ad. *Chromatojulus*	F_X	autumn	43	17,4	1	178,84	181,69	74,63	75,82	0,066	0,028	—	—	1,34	1,12
14.	ad. *Chromatojulus*	F_1	spring	11	15,5	4	231,96	234,89	96,26	97,48	0,266	0,110	—	—	2,08	1,97
15.	ad. *Chromatojulus*	F_X	spring	19	15,9	4	178,55	180,88	74,09	75,06	0,123	0,051	—	—	1,01	0,86
16.	juv. *Protracheoniscus*	F_X	autumn	21	18,0	10	15,23	15,50	5,01	5,10	0,013	0,004	—	—	0,32	0,26
17.	juv. *Protracheoniscus*	F_X	autumn	21	18,0	10	13,95	14,27	4,59	4,69	0,015	0,005	—	—	0,33	0,25
18.	ad. *Protracheoniscus*	F_X	autumn	11	18,8	10	38,14	37,95	12,55	12,49	—0,017	—0,006	—	—	0,74	0,63
19.	ad. *Protracheoniscus*	F_X	autumn	16	18,5	5	19,89	19,73	6,55	6,49	—0,010	—0,003	—	—	0,39	0,31
20.	ad. *Protracheoniscus*	F_1	autumn	15	21,0	10	25,43	25,56	8,37	8,41	0,009	0,003	—	—	1,02	0,97

values, determined by the average water content of the animals. The average water content of the species is shown in Table 2.

I call special attention to the interesting fact that in a number of cases the weight of the animals after 48 hours fasting increased, instead of decreasing though their intestines had been emptied. So e. g. one adult *Chromatojulus* added 1,1 mg to its weight, five individuals of adult *Protracheoniscus* showed an increase of 0,6 mg in their collective weight and ten specimens of subadult *Protracheoniscus* grew heavier by 1,3 mg in all. The only explanation of this phenomenon I so far can offer is the assumption that the animals took a larger quantity of water at such times.

I summed up the data concerning the daily changes in the weight of the animals in Table 3. They are given in percentages computed from the values of the animal's weight measured at the beginning of each experiment irrespectively of its duration. This may involve some errors, because in calculating the percentages I disregarded the daily changes in the weight of the animals. Nevertheless this method prove sufficiently exact since the weight of the animals changed but little during the period of the experiments as seen in the Table. Within the limits of the daily fluctuations of temperature (16—22 °C) the growth of the animals was so slow that their daily gain in weight never reached 0,25 %. Greater differences between the rates of the growth of the three species can not be shown, but the slight differences to be found can be explained by the different susceptibility of the respective species to laboratory conditions. The data thus obtained enable us to draw conclusions only with the greatest reservation concerning the growth of the animals in natural conditions, though one thing is certain : their growth is considerably slow also in field conditions. If we suppose that the *Glomeris* specimens, which were the easiest to raise, increased their weight daily by 0,1% then 838 days were needed for their complete development. My basis here was 0,9 mg live weight at the time of hatching and 200 mg at the time of full development. This length of time seems to be a pretty correct estimate, as for instance KÜKENTHAL puts the life span of Diplopoda at 3 years.

In addition the *Glomeris* specimens even moulted during the experiments. According to my observations, each individual moulted every hundred days (computed by statistical data). I will also mention the fact that though the *Protracheoniscus* used in these experiments did not moult, individuals belonging to this species did moult in the course of other tests. In the case of *Chromatojulus* specimens on the other hand moulting occurred but exceptionally. Occasionally I have recorded a certain decrease in the weight of some adult animals. It can be inferred from these observations that after the attainment of a certain size the weight of the animals will not or will but very slightly increase.

Table 4 shows the daily amount of food consumed by the animals bred in the autumn, expressed by percentages of their initial live weight and absolute

Table 2

Species	*Glomeris hexasticha*	juv. *Chromatojulus projectus*	ad. *Chromatojulus projectus*	*Protracheoniscus politus*
Water content of animal (related to abs. dry weight).....	70,35%	59,25%	58,27%	67,09%

Table 3

Number	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Species	juv. *Glomeris*	juv. *Glomeris*	juv. *Glomeris*	ad. *Glomeris*	ad. *Glomeris*	ad. *Glomeris*
Daily change in weight of 1 animal, in percentage of initial live weight	0,018	0,062	0,049	0,051	0,057	—0,079
Number of animals moulted during experiments	3 of 10	2 of 10	4 of 10	1 of 10	—	3 of 5

Number	6/1.	6/2.	7.	8.	9.	10.
Species	ad. *Glomeris*	ad. *Glomeris*	ad. *Glomeris*	ad. *Glomeris*	juv. *Chromato-julus*	juv. *Chromato-julus*
Daily change in weight of 1 animal, in percentage of initial live weight	—0,170	0,106	0,025	0,230	0,210	0,140
Number of animals moulted during experiments	3 of 5	—	1 of 5	—	—	—

Number	11.	12.	13.	14.	15.
Species	ad. *Chromatojulus*	ad. *Chromatojulus*	ad. *Chromatojulus*	ad. *Chromatojulus*	ad. *Chromatojulus*
Daily change in weight of 1 animal, in percentage of initial live weight	—0,160	0,076	0,037	0,110	0,069
Number of animals moulted during experiments	—	—	—	—	—

Number	16.	17.	18.	19.	20.
Species	juv. *Protracheo-niscus*	juv. *Protracheo-niscus*	ad. *Protracheo-niscus*	ad. *Protracheo-niscus*	ad. *Protrach eo-niscu s*
Daily change in weight of 1 animal, in percentage of initial live weight	0,084	0,110	—0,045	—0,049	0,034
Number of animals moulted during experiments	—	—	—	—	—

Table 4

Number	Species	Litter layer used for feeding	Temperature mean °C	Live weight of 1 animal (mg) at the beginning of experiments	Abs. dry weight of 1 animal (mg) at the beginning of experiments	Daily consumption of litter (abs. dry weight) by 1 animal in percentage of its initial: live weight	Daily consumption of litter (abs. dry weight) by 1 animal in percentage of its initial: abs. dry weight	Value of the VAN DER DRIFT constant
6/2.	ad. *Glomeris*.....	F_1	16,7	202,22	59,95	1,08	3,65	0,14
3.	juv. *Glomeris*	F_X	17,5	53,91	15,98	0,83	2,82	0,071
6.	ad. *Glomeris*	F_1	19,5	213,07	63,17	1,38	4,65	0,18
4.	ad. *Glomeris*	F_1	20,8	215,13	63,78	1,91	6,43	0,26
5.	ad. *Glomeris*	F_1	20,8	209,76	62,19	1,77	5,98	0,24
6/1.	ad. *Glomeris*	F_1	21,0	213,07	63,17	1,56	5,25	0,21
7.	ad. *Glomeris*	F_1	21,0	198,64	58,89	2,05	6,91	0,27
1.	juv. *Glomeris*	F_1	21,1	53,73	15,93	3,11	10,48	0,26
2.	juv. *Glomeris*	F_1	21,1	50,28	14,90	2,72	9,17	0,23
10.	juv. *Chromatojulus*	F_X	17,4	110,34	44,96	0,93	2,28	0,081
12.	ad. *Chromatojulus*	F_X	17,4	338,37	141,20	0,43	1,03	0,054
13.	ad. *Chromatojulus*	F_X	17,4	178,84	74,63	0,75	1,79	0,076
11.	ad. *Chromatojulus*	F_1	18,4	244,10	101,86	0,83	2,82	0,11
9.	juv. *Chromatojulus*	F_1	21,8	125,08	50,97	2,70	6,63	0,24
16.	juv. *Protracheoniscus*....	F_X	18,0	15,23	5,01	2,07	6,31	0,11
17.	juv. *Protracheoniscus*....	F_X	18,0	13,95	4,59	2,38	7,21	0,12
19.	ad. *Protracheoniscus*....	F_X	18,5	19,89	6,54	1,96	5,96	0,11
18.	ad. *Protracheoniscus*....	F_X	18,8	38,14	12,55	1,94	5,91	0,14
20.	ad. *Protracheoniscus*....	F_1	21,0	25,56	8,37	4,01	12,19	0,25

dry weight. It will be seen that the animals consumed a rather small amount of leaves, a daily 0,5—4% of their live weight only. (Litter leaves measured in absolute dry weight.) This value is lower than what the one recorded in the literature [5]. VAN DER DRIFT carried on similar experiments with the species *Glomeris marginata* VILLERS and *Cylindrojulus silvarum* MEINERT [14]. He kept adult specimens of the former species at 18 °C, fed them with leaves of 55% water content, and found that they had consumed a daily 5,2% of their live weight. Bred on leaves of a higher (70%) water content, the animals consumed daily 9—21% of their live weight. He found the amount of food consumed by *Cylindrojulus silvarum* to be only slightly less. (The above numbers are the converted values of VAN DER DRIFT's data who measured food in aerial dry weight and recorded the amount consumed during more than one day.)

It is difficult to interpret correctly the above differences in the amount of food consumed. Though there is a possibility that the metabolism of my animals, owing to long captivity, decreased and so my figures are below the values of those in natural conditions, yet, on the other hand, I should consider it a source of error in VAN DER DRIFT's experiments that they lasted but for a short period (5 days). Because of the previous fasting the animals possibly consumed more food than under normal circumstances, a supposition which seems to be supported by my observations.

It can also be seen from Table 4 that — as stated by VAN DER DRIFT [14] — the smaller (younger) specimens of the identical species consume relatively more food than the larger (adult) ones; the quantity, however, of the food

consumed is in proportion to the active surface of the consumers. The surface of the young ones is relatively larger, that of the adult ones smaller. The active surface of the animals is usually expressed by the formula $\sqrt[3]{g^2}$, that is $g^{2/3}$, where g equals the weight of the animals, in this case their initial absolute dry weight. In the last column of Table 4 I give the quotient of the daily amount of food consumed (expressed in absolute dry weight) and of the cube-root extracted from the square of their weight, which we call, with BALOGH [1], the VAN DER DRIFT constant. According to what was said above, this value must be a constant, independent of the size of the animal. This can be ascertained from Table 4, if we compare animals bred on identical food and kept on identical or almost identical temperature. Thus, for instance, the VAN DER DRIFT constant oscillates between 0,21—0,27 in the case of *Glomeris* specimens (Experiments 4, 5, 6/1, 7, 1, 2), between 0,054—0,081 in the case of *Chromatojulus* specimens (Experiments 10, 12, 13), and between 0,11—0,14 with *Protracheoniscus* specimens (Experiments 16, 17, 18, 19). These values move within rather close limits, only the largest individual among the *Chomatojulus* specimens shows a considerably smaller figure. This same phenomenon was observed also by VAN DER DRIFT [14] who, too, attributes it to the decreased metabolism of a senescent organism.

If we compare the VAN DER DRIFT constants of animals belonging to different species, we find that the VAN DER DRIFT constant (0,071) of *Glomeris* specimens kept at 17,5 °C in Experiment 3 can be inserted between the VAN DER DRIFT constant values (0,054—0,081) of *Chromatojulus* specimens bred at a temperature of 17,4 °C, and that this constant (0,24) of the *Chromatojulus* species (bred at 21,8 °C in Experiment 9) and that (0,25) of the *Protracheoniscus* specimens (bred at 21,0 °C in Experiment 20) can be inserted between the 0,21—0,27 VAN DER DRIFT constant values of *Glomeris* specimens (kept at 20,8—21,1 °C). These figures show that the type of metabolism of species belonging to the same habits is by and large analoguous. This applies to species systematically so distant as are Diplopoda from Isopoda. Hence I presume that the quotient of the amount of food consumed and of the 2/3 power of the weight, that is, the VAN DER DRIFT constant of animals having the same habit living in similar biocoenoses is, irrespective of the species and of the size of the single individual, in identical climatical (season, temperature, humidity, etc.) conditions and consuming identical food is indeed invariable. Not even the form of the animals will influence the above statement. Some of the experiments seem to show that the VAN DER DRIFT constant of *Chromatojulus* specimens is slightly lower than that of the two other species (in similar conditions) but this can again be explained by the assumption that these animals will endure laboratory conditions less easily.

Among others, BORNEBUSCH [4], BUDDENBROCK [3, p. 202], BERTALANFFY [3], and MÜLLER [3, p. 202] also discussed the VAN DER DRIFT constant. As

to the validity of this constant, their opinions are different. Some of them contest whether it holds good for the individuals of different species, others again doubt its applicability to specimens of different size within the same species.

Table 4 gives also good evidence of the fact that changes in temperature have a strong influence upon the intensity of metabolism. On the basis of what has been said above, the VAN DER DRIFT constant also lends itself to express metabolical changes effected by temperature, under identical conditions including food consumption. I have, therefore, grouped in Table 5 the VAN DER DRIFT constants obtained from the food consumption of animals bred in the autumn so as to form two groups according to the two kinds of food used in the experiments, and within these two groups in the succession dictated by the increasing temperature values.

Table 5

Feeding litter from layer F_1											
	Number	6/2.	11.	6.	4.	5.	20.	6/1.	7.	1.	2.	9.
	Temperature mean	16,7	18,4	19,5	20,8	20,8	21,0	21,0	21,0	21,1	21,1	21,8
	Value of the VAN DER DRIFT constant	0,14	0,11	0,18	0,26	0,24	0,25	0,21	0,27	0,26	0,23	0,24

Feeding litter from layer F_X									
	Number	10.	12.	13.	3.	16.	17.	19.	18.
	Temperature mean	17,4	17,4	17,4	17,5	18,0	18,0	18,5	18,8
	Value of the VAN DER DRIFT constant	0,081	0,054	0,076	0,071	0,11	0,12	0,11	0,14

The amount of food consumed will show a rapid growth in rising temperature. VAN DER DRIFT, on the basis of his experiments, places the temperature optimum of the species he examined between 17,5—22,5 °C. The temperature optimum of the species used in my experiments will probably be higher, as food consumption showed a strong increase even between 19,5—21,0 °C. This is presumably due to the fact that, though the winter in the Netherlands (where the animals examined by VAN DER DRIFT come from) is somewhat warmer than in Hungary, the temperature of the warm season — most important from the point of view of the active work of the animals — will rise higher in our country (the average temperature of the warmest month in Amsterdam, August, is 18,7 °C, whilst that of our hottest month, July, is 21,9 °C in Budapest).

The relatively low value of the VAN DER DRIFT constant of the animals used in Experiment 11 can be explained by the sickness of the animals, apparent also in the striking loss of their weight.

The Table shows also that the animals that were fed with the litter of layer F_1, consumed more foodstuff than those fed on the leaves of layer F_x. The quantity of the food consumed will, therefore, be influenced by its quality, that is by the rate of decomposition of the foodstuff.

Table 6

Number	Species	Layer of litter used for feeding	Temperature mean °C	Live weight of 1 animal (mg) beginning of experiments	Abs. dry weight of 1 animal (mg) beginning of experiments	Daily consumption of litter (abs. dry weight) by one animal in percentage of its initial: live weight	Daily consumption of litter (abs. dry weight) by one animal in percentage of its initial: abs. dry weight	Value of the VAN DER DRIFT constant
14.	ad. *Chromatojulus*	F_1	15,5	231,96	96,26	0,89	2,16	0,099
15.	ad. *Chromatojulus*	F_X	15,9	178,55	74,09	0,57	1,37	0,057
8.	ad. *Glomeris*	F_1	16,1	161,39	47,85	1,38	4,64	0,17

Experiments 8, 14, 15, the consumption data of which are shown on Table 6, were performed in the spring. This enables us to examine also the effect of the seasons on metabolism. The figures, and mainly the values of the VAN DER DRIFT constant, go to show that the metabolism of the animals is higher in the spring than in the autumn. Experiment 14 (at 15,5 °C) will not by its 0,99 value of the VAN DER DRIFT constant, fall much short at the value of the VAN DER DRIFT constant in Experiment 6/2 (at 16,7° C); the value of the VAN DER DRIFT constant in Experiment 15 (at 15,9 °C) approaches the one measured at 17,4 °C in the autumn, whilst the value of the VAN DER DRIFT constant in Experiment 8 (at 16,1 °C) comes close to the one measured in the autum (at 19,5 °C). Therefore, a definite seasonal cycle can be observed in the metabolism of the animals. Finally, the effect of the quality of the food material, described in the discussion of the experiments made in the autumn, can be ascertained in these cases.

The data given in Table 7 show the rate of the utilization of the food material taken by the animals. They will tell us how much of 100 absolute dry weight of food was built into the organism of the animals, how much was discharged as excrement, and, finally, what is the amount of the "material waisted" by way of oxydation.

It can be stated that the "building in" of the food into the organism is limited to a maximum of 7%, including even the chitinous exuviae of the moulting animals. Sometimes with adult specimens the food serves exclusively for the maintenance of metabolical processes. The proportion of the produced excrement and the waste as related to the food shows a striking difference according to the quality of nutriment. The percental rate of the excrement of animals fed on litter from layer F_1 is high (87,63—96,23%), with a concur-

Table 7

Number	Species	Layer of litter used for feeding	Time of experiment (season)	Temperature mean °C	Amount (in abs. dry weight, and in percentage of abs. dry weight of the food material) of			
					the material built into the body of the animals	the moulted exuviae	the excrement	the „waste of material"
1.	juv. *Glomeris*	F_1	autumn	21,1	0,17	2,48	93,81	3,53
2.	juv. *Glomeris*	F_1	autumn	21,1	0,66	1,94	94,65	2,75
8,	ad. *Glomeris*	F_1	spring	16,1	4,99	—	95,59	+0,58
6.	ad. *Glomeris*	F_1	autumn	19,5	—1,69	6,83	93,51	1,35
4.	ad. *Glomeris*	F_1	autumn	20,8	0,78	4,41	96,04	+1,23
5.	ad. *Glomeris*	F_1	autumn	20,8	0,97	—	96,23	2,80
7.	ad. *Glomeris*	F_1	autumn	21,0	0,36	1,39	95,13	3,12
9.	juv. *Chromatojulus*	F_1	autumn	21,8	3,22	—	87,63	9,14
14.	ad. *Chromatojulus*	F_1	spring	15,5	5,31	—	94,94	+0,25
11.	ad. *Chromatojulus*	F_1	autumn	18,4	—6,93	—	94,83	12,10
20.	ad. *Protracheoniscus* ...	F_1	autumn	21,0	0,27	—	94,88	4,85
3.	juv. *Glomeris*	F_x	autumn	17,5	1,69	5,61	83,26	9,44
10.	juv. *Chromatojulus*	F_x	autumn	17,4	6,14	—	80,09	13,77
15.	ad. *Chromatojulus*	F_x	spring	15,9	5,01	—	85,04	9,95
12.	ad. *Chromatojulus*	F_x	autumn	17,4	7,39	—	79,72	12,89
13.	ad. *Chromatojulus*	F_x	autumn	17,4	2,04	—	83,50	14,46
16.	juv. *Protracheoniscus* ...	F_x	autumn	18,0	1,32	—	82,91	15,77
17.	juv. *Protracheoniscus* ...	F_x	autumn	18,0	1,44	—	81,31	17,25
19.	ad. *Protracheoniscus* ...	F_x	autumn	18,5	—0,80	—	80,26	20,54
18.	ad. *Protracheoniscus* ...	F_x	autumn	18,8	—0,76	—	84,89	15,87

rently low rate of waste (0—12,10%), whilst the weight of the excrement related to the food consumed by animals fed on litter from layer F_x is much less (79,72—85,04%), — and so the waste is even higher (9,44—20,54%). In this connection I have to mention that, if we disregard the result of Experiment 11, the above difference will be even more marked, as the waste within the former groups will decrease to 0—9,14%. The exclusion of Experiment 11 from this discussion is justified by the fact that the waste in this case was the consequence of the strong decrease in the weight of the animals which, in turn, should be ascribed to their probable sickness as mentioned above. The slight material surplus showing up in some cases in the metabolism of animals fed on litter leaves of layer F_1 is probably the result of experimental error.

In my opinion these data will bring to an issue the debate which arose about the function of these animals in the decomposition of the litter. According to the analyses of FRANZ and LEITENBERGER [8], who fed diplopods on freshly fallen leaves, the excrement of the animals exhibited a considerable rate of humification. VAN DER DRIFT [14] on the contrary, found the excrement of animals fed on litter leaves of layer F_1 to be in a state of humification only slightly above that at the food consumed.

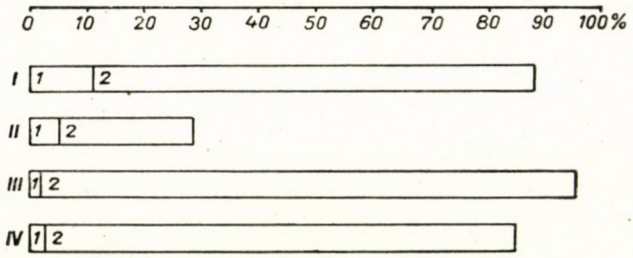
If we take into consideration that the waste of material in the metabolism of the animals is the function of the intensity of decomposition, we may rightly

assert that the rate of the humifying processes taking place in the intestinal canals of the animals varies in accordance with the chemical composition and the state of the food consumed. Accordingly, the differences in the results obtained by FRANZ and LEITENBERGER, on the one hand, and by VAN DER DRIFT on the other, may be ascribed to the different state of the litter leaves fed to the animals. The difference in the decomposition of different food materials still remains to be explained. Though it is easier to imagine that the animal utilizes a more adequate food more intensively, which then involves a greater amount of waste, still I concur with VAN DER DRIFT in the assumption that the higher amount of waste emerges in the case of the consumption of a less adequate food. In the leaves of layer F_1 there may be chemical compounds in a state of decomposition as will render the food material easily utilizable. After the utilization of the food and the discharge of the remnants there is a new possibility for the intake of fresh food. These compounds will not yet have come into existence in the freshly fallen litter, nor can they be found any longer in the litter of layer F_x, and consequently in both cases, the food has to undergo greater chemical changes in the intestines to become utilizable for the animals. This, again, involves a slower defecation. This assumption, however, — though in want of thorough physiological elucidation — seems to be supported by the observation that the animals consumed less food from the litter of layer F_x the consumption of which resulted in a higher amount of waste than from the litter of layer F_1 whilst freshly fallen litter undergoing strong decomposition after consumption as shown by FRANZ and LEITENBERGER is indeed reluctantly consumed by the animals.

From the point of view of productive biology the most important point is to know the different courses of the food consumed. Comparing them with the total food circulation of Arthropoda feeding on other kinds of vegetable matter, we find a characteristical excess of the weight rate of the excrement over the proportion of the material built into the organism. In the case of caterpillars of *Hyphantria cunea*, an animal feeding on live plant material (a primary consumer), I found together with BALOGH [2] that the animals had, during their development turned 77,5% of the food into excrement, built 11,5% intotheir bodies, and used 11,0 %to cover the energy necessary for lifefunctions. I found this proportion to be shifted in favour of building in purpose in the case of *Ephestia kuehniella* caterpillars, fed on meal, a dry vegetable material [10]. Here, apart from the extraordinary metabolism previous to pupation, the building in was 5,4%, with a concurrent excremental weight of 23,3%, at a temperature of 26—27 °C. (The high value of waste — 71,3% — is caused by the burning of the meal to ensure the necessary amount of water.) The mean values for the animals discussed in this paper, are as follows : 2,3% of the amount of food is built into the organisms, 94,3% is turned into excrement and 3,4% into waste in the case of feeding on litter leaves from layer F_1 ; this pro-

portion changes to 3,2 : 82,3 : 14,5 when feeding on litter from layer F_X. (Al figures related to the absolute dry weight of the food consumed). Graph 1 wil make more conspicuous what has been said above.

These animals turn a strikingly large proportion of the food consumed into excrement, hastening thereby the decomposition of the litter store of the biocoenoses, that is, the coenoses of the litter stratum. The frequently contradictory data in the literature concerning the function of these animals must, however, be revaluated to a certain extent on the basis of my recent researches. I wish to make clear, on the one hand, that, albeit the function of the detrito-



Graph 1

I. *Hyphantria cunea* Drury, II. *Ephestia kuehniella* Z, III. Diplopoda and Isopoda, feeding on litter leaves from layer F_1, IV. Diplopoda and Isopoda, feeding on litter leaves from layer F_X. The abs. dry weight proportions of materials built into the bodies of the animals [1], and the abs. dry weight proportions of excrement [2] related to the abs. dry weight of food consumed

phagous macrofauna of the forest litter consists primarily in the enlargement of the surface by breaking up the food, their part played in the chemical decomposition must in certain conditions still be looked upon as also rather significant ; on the other hand, that according to the data relating to the quantitative proportions of food consumption, the amount of litter consumed yearly by the macrofauna in our forests is essentially smaller than has been supposed to be. Nevertheless I do not consider our present knowledge sufficient for the numerical computation of the consumed litter material. Yet it is my profound conviction that our orientation along this line will be facilitated by the specific independece of the VAN DER DRIFT constant, because the use of this constant enables us to infer the amount of food consumed by all detritophagous species from the food consumed by the individuals of any size belonging to a detritophagous arthropodan species living in the same plant association.

J. BALOGH gave me valuable guidance in setting the experimental objectives and in evaluating the results. I. LOKSA was kind enough to identify the animals used in the experiments. I am greatly indebted to them for their help and assistance.

REFERENCES

1. BALOGH, J. (1953) Grundzüge der Zoozönologie. Akadémiai Kiadó, Budapest.
2. BALOGH, J., GERE, G. (1953) Über die Ernährungsbiologie und Luftstickstoffbindung der *Hyphantria*-Raupen. *Acta Biol. Hung.*, **4**, 431—452.
3. BERTALANFFY, L. (1942) Theoretische Biologie. II. Borntraeger, Berlin—Zehlendorf.
4. BORNEBUSCH, C. H. (1930) The fauna of the forest soil. *Forstl. forsögsw. Danmark.*, **11**, 1—224.
5. DUDICH, E. BALOGH, I., LOKSA, I. (1952) Produktionbiologische Untersuchungen über die Arthropoden der Waldböden. *Acta Biol. Hung.*, **3**, 295—317.
6. FRANZ, H. (1950) Bodenzoologie als Grundlage der Bodenpflege. Akademie-Verlag, Berlin.
7. FRANZ, H. (1951) Biologisch richtige Düngung (Mit besondere Berücksichtigung des Dauergrünlandes). *Bodenkultur*, **5**, 325—336.
8. FRANZ, H., LEITENBERGER, L. (1948) Biologisch-chemische Untersuchungen über Humusbildung durch Bodentiere. *Österr. Zool. Z.* **1**, 498—518.
9. FRANZ, H., REPP, G. (1949) Untersuchungen über die Stallmistrotte im Stapel und im Boden. *Bodenkultur*, **3**, 465—486.
10. GERE, G. (1951) Vizsgálatok a lisztmoly (*Ephestia kuehniella* Z.) táplálkozásbiológiájáról. Investigation regarding the nutritive biology of the flour moth (*Ephestia kuehniella* Z.) *Ann. Biol. Univ. Hung.*, **1**, 51—64. (In Hungarian, with English summary.)
11. KÜHNELT, W. (1950) Bodenbiologie. Herold, Wien.
12. MACFADYEN, A. (1948) The meaning of productivity in biological systems. *J. anim. Ecol.*, **17**, 75—80.
13. STRENZKE, K. (1949) Die biozönotischen Grundlagen der Bodenzoologie, *Z. Pflanzenernähr. Düngung*, **45**, 245—262.
14. VAN DER DRIFT, J. (1949) Analysis of the animal community in a beech forest floor. Ponsen & Looijen, Wageningen.
15. VAN DER DRIFT, J. (1950) De Bodemfauna in onze bossen, *Nederl. Boschbouw Tijdschr.*, **2—3**, 31—43, 67—76.
16. VAN DER DRIFT, J. (1950) De betekenis van de Levensgemeenschap van de Grond. *T. N. O.—nieuws*, **5**, 1—6.

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИИ ПИТАНИЯ DIPLOPODA И ISOPODA И ИХ РОЛИ В ГУМИФИКАЦИИ

Описывается работа по биологии питания и роли в гумификации гниепоедающих видов Diplopoda и Isopoda, живущих в ярусе лесной подстилки. По данным прибавление веса животных в экспериментальных условиях идет чрезвычайно медленно, во всех случаях менше 0,25% в день. Животные каждый день поедали соответствующий 0,5—4% живого веса своих тел подстилочный лист. Это количество меньше чем, которое указывается в литературе. Животные, обладающие меньшим объемом тела, по сравнению с животными, обладающими более большим размером, в тождественных условиях поедают больше питательных веществ. По закону поверхности констант *Ван дер Дрифта* (VAN DER DRIFT) (частное от веса поедаемого питательного вещества в день животными и от кубического корня квадрата живого веса) независит от величины животных, а приблизительно является постоянным числом. Величина константа *Ван дер Дрифта* в тождественных условиях не зависит не только от величины животных, но не зависит и от их видовой принадлежности. Это дает возможность нам при знании биологии питания одного гниепоедающего членистоногих сделать заключение по поводу деятельности других видов в расщеплении листьев лесной подстилки.

При повышении температуры быстро повышается потребление в пище. С этой точки зрения оптимум наверно находится на несколько градусов выше 20°C. Исследуемые виды показывают древнейший цикл, поскольку обмен веществ у них весной идет более интенсивно, чем осенью. Количество всасываемой части пищи зависит и от меры распада (гниения) листьев лесной подстилки. Только незначительная часть принимаемой пищи, всего 0,7% становится потом составной частью самого организма. Степень употребления пищи зависит от самих питательных веществ. Питая животных дубовой подстилкой, получаемой из яруса F_1, вес экскремента (фекалии) достиг 87,63—96,23% всего принимаемого питательного вещества, вес оксидируемого вещества 0—9,14%. Напротив, питая животных листьями лесной подстилки из яруса F_x экскремент (фекалия) был всего около 79,72—85,04%, а нужда в питательных веществах возросла на 9,44—20,54%. Итак,

листья лесной подстилки из яруса F_1 животные могут переваривать только в меньшей степени, чем листья лесной подстилки из яруса F_X.

С точки зрения гумификации это значит, что пока опавшая листва из яруса F_1, переходя через кишечник размельчается только механически, опавшая листва из яруса F_X за это же время претерпевает значительное химическое изменение.

UNTERSUCHUNG DER ERNÄHRUNGSBIOLOGIE DER DIPLOPODEN UND ISOPODEN UND IHRE ROLLE IN DER HUMIFIKATION

Es werden die Ergebnisse der Untersuchungen betreffend Ernährungsbiologie und Rolle bei der Humifikation saprophytischer Diplopoda- und Isopodaarten der Karstschicht des Waldbodens mitgeteilt. Die Untersuchungen ergaben, dass die Gewichtszunahme der Tiere unter Laboratoriumsbedingungen sehr gering ist, in allen untersuchten Fallen weniger als 0,25% pro Tag.

Die Tiere frassen täglich 0,5—4% ihres Lebensgewichtes. Diese Quantität ist geringer, als die bisher publizierten Angaben. Unter gleichen Bedingungen frassen kleinere Tiere relativ mehr, als grössere. Entsprechend des Oberflächengesetzes ist die VAN DER DRIFT'sche Konstante (Gewicht der täglich aufgenommenen Nahrung dividiert durch die Kubikwurzel des Quadrates des Lebendgewichtes) eine von der Körpergrösse des Tieres unabhängige, annähernd konstante Zahl.

Der Wert der VAN DER DRIFT'schen Konstante ist unter gleichen Bedingungen nicht nur von der Grösse, sondern auch von der Artzugehörigkeit des Tieres unabhängig. Dieser Umstand erlaubt aus der Ernährungsbiologie einer saprophytischen Arthropodenart irgendeines Waldes Schlussfolgerungen zu ziehen über die Abbautätigkeit anderer Arten der gleichen Lebensweise.

Mit steigender Temperatur nimmt die Nahrungsaufnahme der Tiere schnell zu. Das Optimum dürfte etwas über 20° C liegen.

Die untersuchten Arten zeigten einen Saisonzyklus des Stoffwechsels. Der Stoffwechsel war im Frühjahr lebhafter, als im Herbst.

Die Grösse der Nahrungsaufnahme ist auch vom Verwesungsgrad der Blätter abhängig. Nur ein relativ sehr geringer Anteil, 0—7% der aufgenommenen Nahrung wird in den tierischen Körper eingebaut.

Das Mass der Ausnützung der Nahrung ist weitgehend von ihrer Qualität abhängig. Wurden die Tiere mit Eichenlaub aus der F_1 Schicht gefüttert, so betrug das Gewicht des Faeces 87,63—96,23% der aufgenommenen Nahrung, das Gewicht der verbrannten Stoffe dementsprechend 0—9,14%. Wurden dagegen die Tiere mit Blättern aus der F_X Schicht ernährt, schwankt der Faeces zwischen 79,72—85,04% und der Nährstoffmangel stieg auf 9,44—20,54%. Die Tiere verdauen also Blätter aus der ersten Schicht in viel geringerem Masse, als Blätter aus der letztgenannten Schicht. Für die Humifikation bedeutet dies, dass die Blätter der F_1 Schicht auf dem Wege durch den Verdaungstraktus des Tieres nur mechanisch zerkleinert werden, während Blätter aus der F_X Schicht auf demselben Wege einen weitgehenden chemischen Abbau erfahren.

GÉZA GERE, Budapest, VIII., Puskin u. 3., Hungary.

REACTION OF NEWBORN RATS TO THE HETEROLOGOUS TRANSPLANTATION OF EHRLICH'S MOUSE-ASCITES TUMOUR

Gy. CSABA and M. ISKUM

DEPARTMENT OF MORPHOLOGY, RESEARCH INSTITUTE FOR EXPERIMENTAL MEDICINE OF THE HUNGARIAN ACADEMY OF SCIENCES (HEAD: I. TÖRÖ)

(Received May 4, 1955)

Summary

Experiments are described in which EHRLICH's ascitic tumour of mice was transplanted into newborn and a few-day-old rats respectively; having survived transplantation, the tumour could be carried for eight consecutive passages. The success of the transplantations is thought to have been due to the fact that the immune system was undeveloped in rats of the said age. The subsequent development of this system gradually reduced and finally destroyed the tumour. Attempts to transfer the carcinoma to adult rats failed whereas, if transferred back to mice, the tumour was seen to proliferate vigorously.

Introduction

Heterologous transplantations have, so far, been unsuccessful because both embryonic and adult tissues survive in animals of alien species only under exceptional conditions and only for a very short duration. The degeneration of the transplants is attributed by most of the authors to the immunological reaction to alien proteins provoked in the host-organism.

The situation is somewhat different if, instead of normal adult or embryonic tissues, cancerous tissues are transplanted. Tumour tissue often survives transplantation under conditions in which healthy embryonic, and especially adult, tissues are sure to perish. Many heterotransplantations have been effected with success by the lodgement of the transferred tumour in a favourable environment. The anterior chamber of the eye and the brain were found to offer the most convenient sites for a successful growth of transplanted tumours [1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 25, 27], while in certain cases it was the cheek pouch of hamsters that proved favourable to the reception of the transplant [14, 15].

The problem was approached from a different angle by attempts to paralyze the defenses of the organism. These experiments aimed at the weakening of the reticuloendothelial system partly by means of X-radiation, partly with the aid of cortisone, or by a combination of both treatments [10, 14, 23, 24, 25, 26, 27]. Although a number of positive results was obtained in this way, the success of serial passages was dependent in most cases on a preliminary treatment of the successive recipient hosts [25].

The present experiments departed from the theory that, as the organism is devoid of an immune system during the first period of life, it produces no, or but a minimum of, anti-bodies to defend itself from parenterally introduced proteins. Though varying from species to species, this initial period covers as a rule the embryonic stage and a few postnatal days after which organisms usually develop their immuno-biological activity. Taking domestic animals: pigs, rabbits, dogs, and cats, for instance, are born at a more primitive stage of development than herbivorous animals. Pigs are born at a developmental stage which, in sheep, corresponds to that of the foetus when 2½ to 4 months old. While new-born guinea pigs possess an almost fully developed central nervous system and are forthwith capable of an independent existence, rabbits are quite undeveloped when coming into the world, and so are rats [12].

Methods

As regards rats, the embryonic stage must be said to last until the time when the animals begin to grow hair and their eye-slit opens, i. e. until the 13th to 14th day after birth. It was then that the animals were inoculated with tumour. EHRLICH's mouse-ascites tumour was used in the present experiments. The ascitic fluid was obtained from mice 10 days after inoculation. We effected the transplantation with aseptic precautions, below the navel, intraperitoneally, by means of thin subcutaneous needles. Subsequent passages were made every 10 days.

Whenever newborn rats were inoculated we made back transfers to adult mice in order to obtain controls, and we also attempted to transmit the tumour into adult rats.

Experimental

The incidence of takes in our test rats was 100% through the first five generations of test rats infected with EHRLICH's mouse-ascites carcinoma and all inoculated animals died during the two first passages. Takes occurred with gradually diminishing frequency after the fifth passage, and no more take could be obtained in the eigth generation, although — transferred back to mice — the tumour proved to be still positive. It became, however, negative at the next passage, and the tumour perished.

The results of the experiments are collected in Table 1.

Discussion

Heterologously transplanted tumours may be expected to survive if the recipient environment is a favourable one, e. g. the anterior chamber of the eye or the brain, or if the recipient host receives a preliminary treatment, be it X-radiation or the administration of drugs. The first named method was elaborated by GREENE who attributed even diagnostical value to heterotransplantation. Tumours transferred by his method mostly resist further passage. Transferring Crocker 180 sarcomas to hamsters, PATTI and BIESELE [13] found transplantations to be more successful with newborn or just a few day old

Table 1

Results of experiments

Designation of generation	Number of young animals	Age of young animals	Inoculated substance in ml	Takes obtained			Observations
				in young rats %	in adult rats	in mice	
A	7	Newborn	0,15	100	—	+	All animals died on the 14th and 15th day
B	6	4 days	0,15	100	—	+	All animals died between the 10th and 13th day
C	5	2 days	0,05	100	—	+	Two rats survived, their ascites regressed
D	8	1 day	0,05	100	—	+	2,5 ml/head transplanted from control mice to healthy adult rats. Result negative
E	6	Newborn	0,10	100	—	+	Only a slight amount of ascites obtained. The solid tumour developed by one of the rats at the site of the puncture will be minced and suspended
F	11	4 days	0,10	38	—	+	—
G	7	Newborn	0,10	14,3	—	+	—
H	6	Newborn	0,10	—	—	+	Abdominal cavity of young rats to be washed with physiolog. saline and this latter injected into next generation
I	7	4 days	0,10	—	—	—	—

hamsters than older animals. PUTNOKY succeeded in transplanting Ehrlich's mouse carcinoma to rats with the aid of lactic acid, i. e. he, too, had to alter the recipient environment. The tumour thus obtained could be propagated by serial transfer for seven years. Similar experiments were made by BALOGH [2]. The growth of a slightly differentiated mouse carcinoma in rats is described by HALL [9] who failed to effect consecutive passages.

Our experiments were successful in transplanting EHRLICH's mouse-ascites tumour to newborn rats and in carrying it through eight generations. This goes to prove that failures of heterologous transplantations must really be due to immunological factors, and that tumours will survive if these factors are negligible as they were in our newborn rats. The transplant killed the hosts, at least during the earlier passages.

The metabolism of the tumour obviously enables it to utilize alien proteins, for, otherwise, it could not persist even in the absence of an immunological resistance from the host. It is, on the other hand, striking that the adaptability of the tumour is so limited as to prevent its survival in adult hosts. Not even after 7 or 8 passages could it be successfully transferred to adult rats, whereas, transferred back to mice after a propagation of 80 days in newborn rats, it showed vigorous proliferation. This proves that a tumour of this kind retains its mousecharacteristics through any number of passages. This observation is in agreement with PUTNOKI's and HALL's findings.

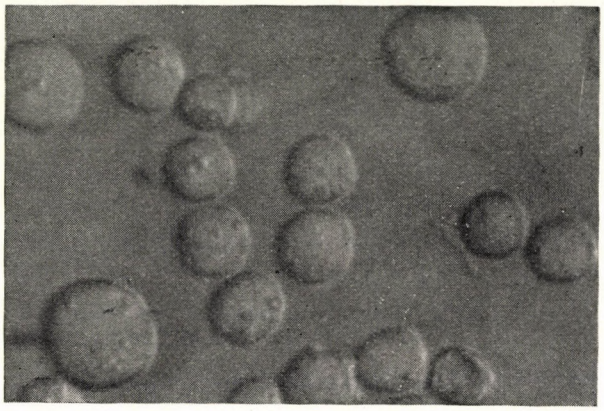


Fig. 1. EHRLICH's ascitic tumour of mice. Native

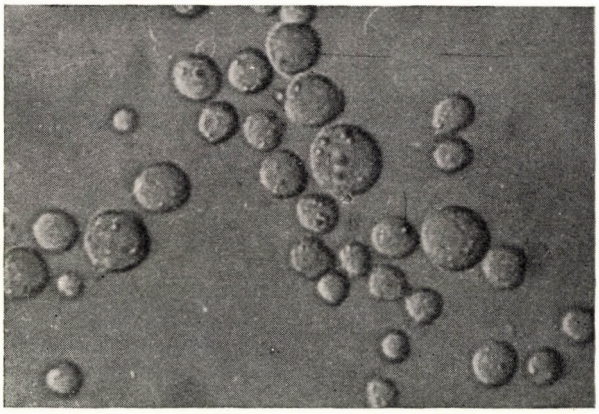


Fig. 2. Tumour cells from generation E. Native

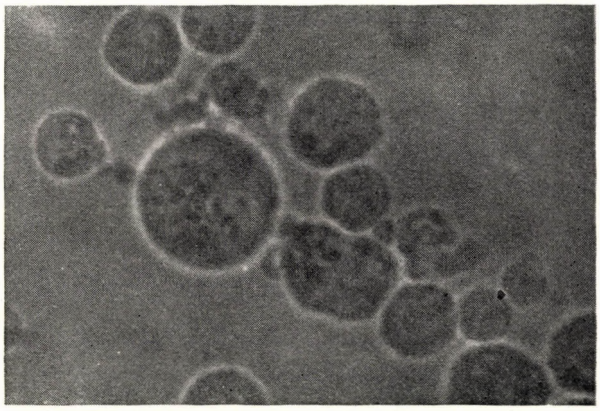


Fig. 3. Tumour cells from generation E. Native

The tumour reveals a gradually decreasing vitality. EHRLICH's ascitic tumour contains anyhow a large number of rounded degenerated cells floating in the ascitic fluid and, as a matter of fact, it is these cells which were transferred to the new hosts. Takes were nevertheless obtained in a 100%, and the test animals were killed by the transplant. The situation was the same in the generations A and B. A gradually increasing number of animals was observed to survive in subsequent passages, while takes were obtained with less and less frequency. Takes occurred in 4 out of 11 rats in the generation F, i. e. at the 6th passage, only in one rat in the generation G, while no ascites was developed by any member of the generation H. A gradual loss of the tumour's vitality was thus perfectly obvious, although the morphological picture still revealed intact cells (figs. 1, 2, 3). This phenomenon will appear as natural if we assume that the immune system began functioning during the 10 days of the tumour's growth, especially when not newborn but 3 to 4-day-old animals were inoculated, and that the immune reaction of the hosts sufficed, if not to kill, at least to devitalize the transplanted tumour. This devitalization of the transplant was furthermore evidenced by the case of some of the test animals that had developed ascites : if these animals succeeded in surviving to an age of 14 to 16 days the ascites was seen to regress by degrees and the rats gradually recovered full health. The process of regression was observed to set in with the generation C already, that is, sooner than the decrease in the number of takes which did not begin before the 6th passage. This, too, points to the beginning activity of the immune system as the cause of the tumour's complete degeneration.

LITERATURE

1. ALBRINK, W. S., GREENE, H. S. N. (1953) The transplantation of tissues between zoological classes. *Cancer Res.*, **13**, 64.

2. BALOGH, E. (1940) Investigation on a new heterologous tumor "Budapest 1938" succesfully in Hungarian white rats. *Am. J. Cancer*, **39**, 45—55.

3. GREENE, H. S. N. (1941) Heterologous transplantation of Mammalian tumors *J. Exper. Med.*, **73**, 461—473.

4. GREENE, H. S. N. (1942) Heterologous transplantation of a human fibrosarcoma. *Cancer Res.*, **2**, 649—654.

5. GREENE, H. S. N. (1951) The transplantation of tumors to the brains of heterologous species. *Cancer Res.*, **11**, 529—534.

6. GREENE, H. S. N. (1952) The use of the brain as a transplantation site. *Cancer Res.* **12**, 266.

7. GREENE, H. S. N. (1953) The transplantation of human brain tumors to the brains of laboratory animals. *Cancer Res.*, **13**, 422.

8. GREENE, H. S. N. (1954) The heterologous transplantation of human testicular tumors. *Cancer Res.*, **14**, 516—518.

9. HALL, J. (1950) Growth of an undifferentiated mouse carcinoma in the albino rat. *Cancer Res.*, **10**, 223.

10. HANDLER, A. H., YERGANIAN, G. (1954) The transplantation of human teratomas and embryonal tissues in Cortisone treated animals. *Cancer Res.*, **14**, 18.

11. HOMBURGER, F., FISHMANN, W. H. (1953) The physiopathology of cancer. Holter, New York.

12. *Крепс, Е. М., Пигарева, З. Д., Четверков, Д. А., Помаванская, Л. П.* (1952) Биохимическая эволюция мозга в онтогенезе и нервная деятельность. *Журн. Высш. Нервн. Деят.*, **2**, 46—56.

13. PATTI, J., BIESELE, J. (1951) Heterologous growth and passages of mouse sarcomas in hamsters. *Cancer Res.*, **11,** 540—542.

14. PATTERSON, W. B., CHUTE, R. N., SOMMERS, S. C. (1954) Transplantation of human tumors into Cortisone-treated hamsters, *Cancer Res.*, **14,** 656—659.

15. PATT, D. I., HANDLER, A. H., LUTZ, E. L. (1952) Heterologuos tumor growth in the cheek pouch of the hamster. *Cancer Res.*, **12,** 287.

16. PUTNOKY, J. (1930) Über die heteroplastische Transplantation der EHRLICHschen überimpfbaren Mäusecarcinoms. *Z. Krebsforsch.*, **32,** 52.

17. PUTNOKY, J. (1933) Über die Anämie der Carcinomratten. *Z. Krebsforsch.*, **39,** 451—454.

18. PUTNOKY, J. (1937) Beiträge zum biologischen Verhalten eines durch heteroplastische Transplantation erzielten ("E—P") Rattencarcinom Stammes. *Z. Krebsforsch.*, **46,** 30—43.

19. PUTNOKY, J. (1940) Beiträge zum immunologischen Verhalten eines durch heteroplastische Transplantation erzielten ("E—P") Rattencarcinom Stammes *Z. Krebsforsch.*, **49,** 382—389.

20. PUTNOKY, J. (1930) On the immunity reactions of a heterotransplantable mouse carcinoma propagated in rats for seven years. *Am. J. Cancer*, **32,** 35.

21. SELBIE, F. (1936) Early stages of the transplantation of the EHRLICH—PUTNOKY tumour into mice and rats. *Am. J. Cancer*, **28,** 530—539.

22. TOOLAN, H. W. (1951) Successful growth and serial transplantation of human tumors in rat and mice irradiated by X-rays. *Cancer Res.*, **11,** 285—286.

23. TOOLAN, H. W. (1952) Growth of human tumors in the subcutaneous tissues of X-radiated laboratory animals : their practical use for experimental purposes. *Cancer, Res.*, **12,** 302.

24. TOOLAN, H. W. (1953) Growth of human tumors in Cortisone-treated laboratory animals : the possibility of obtaining permanently transplantable human tumors. *Cancer Res.*, **13,** 389.

25. TOOLAN, H. W. (1954) Transplantable human neoplasms maintained in Cortisone treated laboratory animals. *Cancer Res.*, **14,** 660—666.

26. TOWBIN, A. (1951) The heterologous transplantation of human tumors. *Cancer Res.*, **11,** 286.

27. TOWBIN, A. (1951) The heterologous transplantation of human tumors. *Cancer Res.*, **11,** 716—722.

РЕАКЦИЯ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС НА ГЕТЕРОТРАНСПЛАНТАЦИЮ АСЦИТИЧЕСКОЙ ОПУХОЛИ ЭРЛИХА БЕЛОЙ МЫШИ

Авторы проводили в своих опытах прививку асцитической опухоли Эрлиха мыши новорожденным крысам или же крысам возраста в несколько дней, причем опухоли приживались, и их удалось перевивать через несколько пассажей. По мнению авторов возможность перевивки обусловливается тем, что в данном периоде жизни иммуногенная система еще не функционировала. С наступлением функции этой системы опухоли все ослабевали и, наконец, разрушались. Взрослым крысам не удалось прививать опухоли, в то время как при обратной перевивке мышам они до самого конца проявляли весьма интенсивный рост.

REAKTION VON NEUGEBORENEN RATTEN AUF DIE HETEROLOGE ÜBERIMPFUNG DES EHRLICHSCHEN ASCITES-TUMORS DER MAUS

In unseren Untersuchungen wurde der EHRLICH'sche Ascites-Tumor von der Maus auf neugeborene bzw. einige Tage alte Ratten überimpft. Nach erfolgreicher Impfung gelang es denselben durch acht Passagen weiterzuimpfen. Unserer Meinung nach lag der Möglichkeit der Überimpfung der Umstand zugrunde, dass im gegebenen Lebensabschnitt bei den Ratten das Immunsystem noch nicht funktionierte. Die beginnende Tätigkeit des Immunsystems führte zu einer stufenweise Abschwächung und schliesslich zur völligen Zerstörung der Geschwulst. Die Geschwulst war auf erwachsene Ratten nicht überimpfbar, auf Mäuse zurückgeimpft zeigte sie hingegen bis zu Ende ein intensives Wachstum.

GYÖRGY CSABA, Budapest, IX., Tűzoltó u. 58, Hungary.
MIKLÓS ISKUM, Budapest, IX., Tűzoltó u. 58, Hungary.

DIE SUBMIKROSKOPISCHE ZELLMEMBRAN VON *ENDAMOEBA BLATTAE* BÜTSCHLI

GYÖRGYI HAJÓSSI und F. GUBA

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE ABTEILUNG DES INSTITUTS FÜR MESSTECHNIK UND INSTRUMENTENWESEN DER UNGARISCHEN AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN (VORSTAND: F. GUBA)

(Eingegangen am 4. Mai 1955)

Zusammenfassung

Auf Schrägagar mit *Aerogenes*-Bakterien gezüchtete Amöben wurden auf einer Kollodiummembran, die auf dem Nährboden schwamm, weitergezüchtet bzw. am Leben erhalten. Diese Amöben wurden mit destilliertem Wasser behandelt sowie mit Formalin- und Osmiumdampf fixiert und unter dem Phasenkontrast- und dem Elektronenmikroskop untersucht.

Im Elektronenmikroskop ist gut erkennbar, dass die untersuchten Amöben (*Endamoeba blattae* BÜTSCHLI) von einer 100 bis 150 Å dicken Zellmembran umgeben sind.

In einer früheren Mitteilung wurde eine von den Verfassern ausgearbeitete elektronenmikroskopische Präparationstechnik beschrieben [3]. Bei den diesbezüglichen Arbeiten, die auf die Entwicklung einer rein präparativen Technik gerichtet waren, wurden als Versuchsmaterial Kulturen von *Endamoeba blattae* BÜTSCHLI verwendet. Die hierbei gemachten Beobachtungen dürften — nach Meinung der Verfasser — eine interessante Ergänzung zu den bisherigen Angaben über die obigen Amöben darstellen, so dass sie im nachstehenden geschildert werden sollen.

Die in die Ordnung *Amoebina* gehörigen Rhizopoden wurden auf Grund von Beobachtungen mit dem Lichtmikroskop als aus nacktem Plasma bestehende Lebewesen beschrieben. Auch nach den neuesten Lehrbüchern wird die Bewegung mittels der Pseudopodien eben durch das Fehlen der Zellmembran ermöglicht [4]. Im Gegensatz zu dieser Anschauung wurde mit der von den Verfassern angewandten Präparationstechnik im Elektronenmikroskop an den Amöben eine äusserst feine submikroskopische Membran wahrgenommen, was mit dem Ergebnis der elektronenmikroskopischen Untersuchungen von BAIRATI und LEHMANN an *Amoeba proteus* übereinstimmt [1].

Das Untersuchungsmaterial bestand aus den in den Kulturen eine längere Zeit am Leben erhaltenen *Endamoeba blattae* BÜTSCHLI. Als Grundbakterium wurden *Aerogenes*-Bakterien in die Schrägagar-Bouillon geimpft. Die Bakterien begannen sich nach 24stündiger Inkubation bei 37° C zu entwickeln. Danach wurde diese Bakterienkultur mit den Versuchsamöben beimpft. Nach 48 Stunden bei Zimmertemperatur krochen die Amöben auf den Nährboden hinauf und verursachten eine Transparenz der Bakterienkultur. Dann wurden die Amöben

mit Tyrodelösung vom Nährboden abgewaschen und die Waschflüssigkeit bei 500 U/min zentrifugiert, so dass sich die Amöben absetzten, wonach diese wieder mit Tyrodelösung suspendiert wurde. Diese Reinigungsoperation wurde zwei- oder dreimal wiederholt. Im weiteren wurde die so gewonnene Amöbensuspension benutzt, in der trotz der obigen Reinigung noch immer Bakterien verblieben (Abb. 1).

Zur Durchführung von elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die Amöben 6 bis 24 Stunden lang auf einer Kollodiummembran, die auf

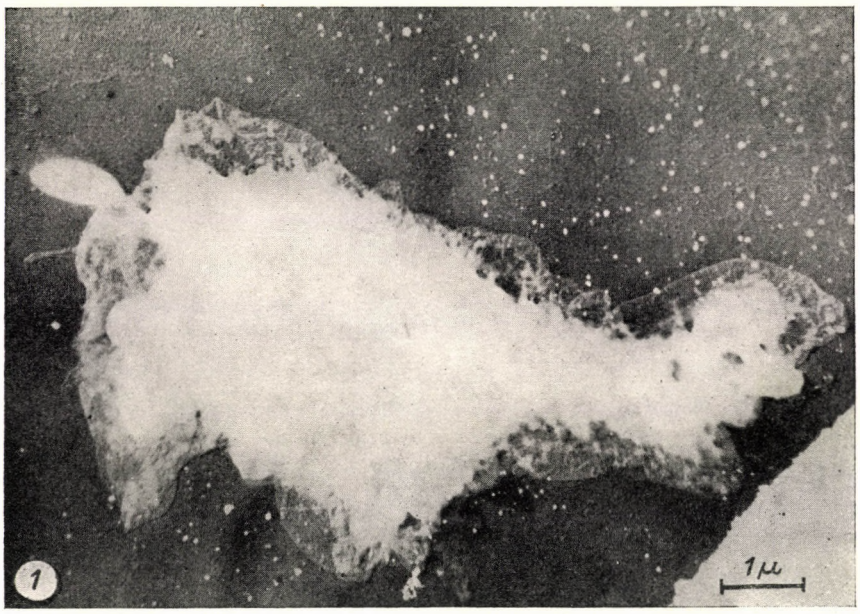
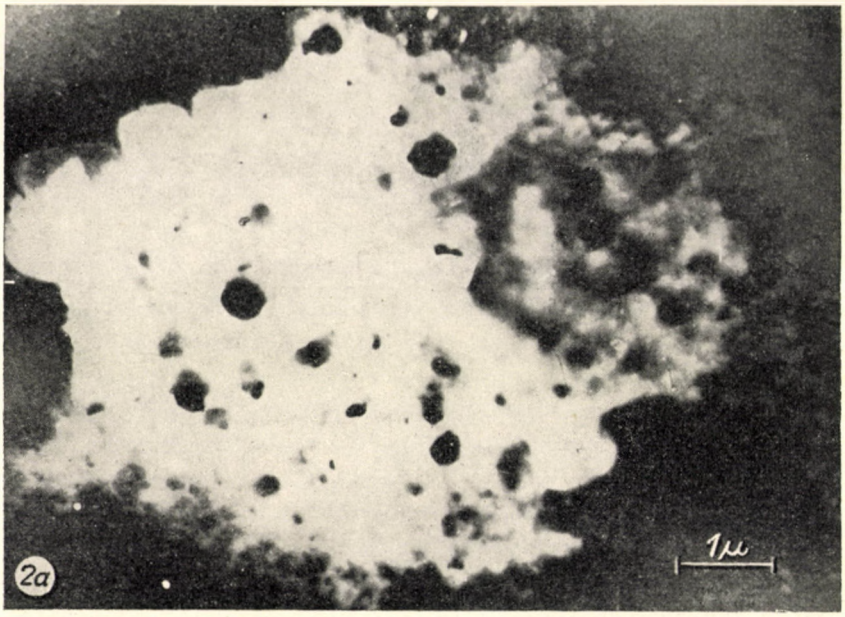


Abb. 1. Zellmembran um eine Amöbe. Im Pseudopodium der Zelle befinden sich phagozytierte Bakterien *(Aerogenes)*. Fixierung mit OsO_4-Dampf. Goldbeschattung. 9600 ×

einer Serumnährlösung schwamm, weitergezüchtet bzw. am Leben gehalten. Die Amöben krochen auf der Membran herum und ernährten sich teils von den *Aerogenes* die bei der Aufbringung der Amöben auf die Membran als Verunreinigung gleichfalls dorthin gelangt waren, hauptsächlich aber vom Serumnährboden, indem sie durch die Kollodiummembran hindurchdrangen.

Die aus den obigen Kulturen hergestellten lichtmikroskopischen Präparate zeigen das übliche Bild der Amöben. Nach den mikroskopischen Beobachtungen mit dem Phasenkontrastverfahren leben die Amöben auch 24 Stunden auf der Kollodiummembran, sie kriechen dort herum, wobei sich auf einem grossen Teil der Zelle noch keine Degenerationserscheinung zeigte.



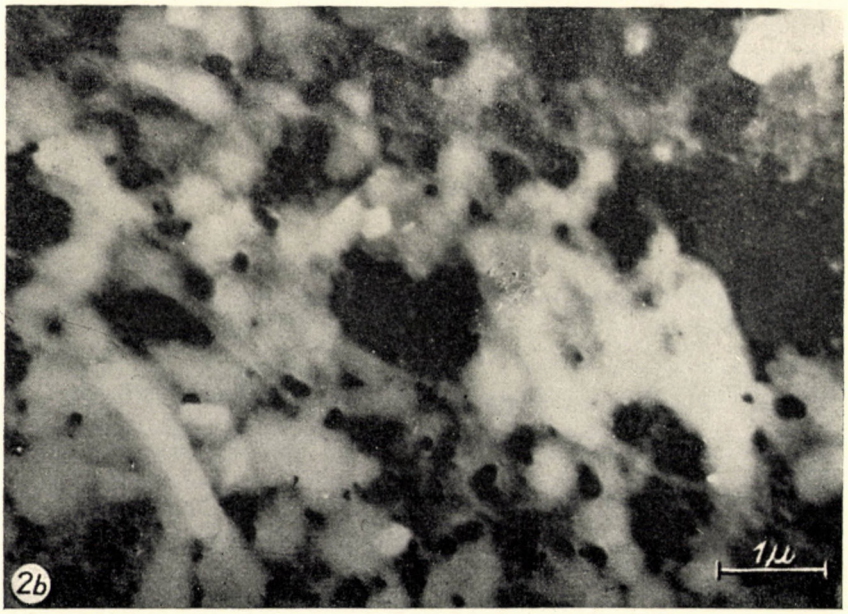


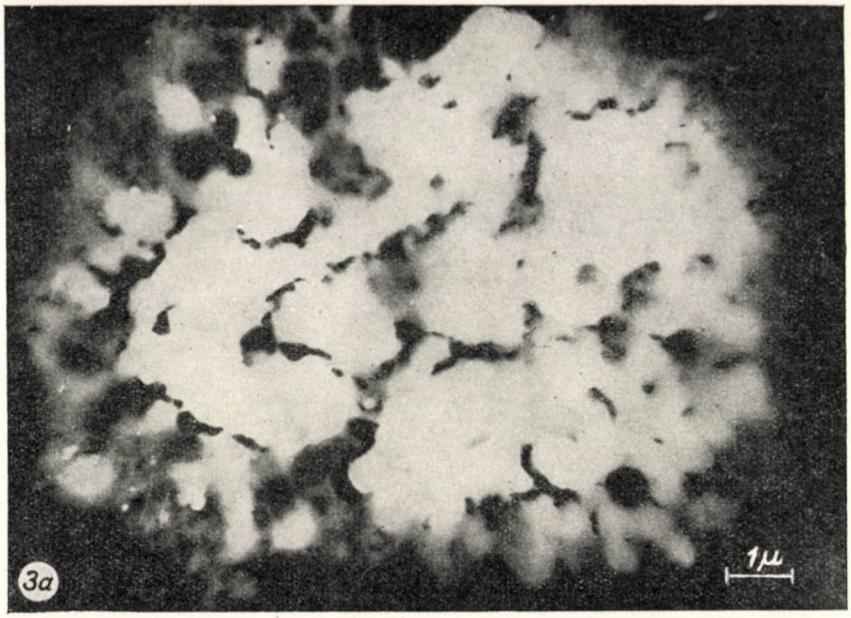
Abb. 2a. Amöbenkultur nach 30minütiger Behandlung mit dest. Wasser (Diffusion). Die Zelle ist stark vakuolisiert. Fixierung mit OsO_4-Dampf. Goldbeschattung. 9600 ×
Abb. 2b. Amöbenkultur nach 60minütiger Behandlung mit dest. Wasser (Diffusion). Die Zelle ist in Granulen zerfallen. Fixierung mit OsO_4-Dampf. Goldbeschattung. 13 800 ×

Um zu untersuchen, was für Artefakten infolge der elektronenmikroskopischen Präparation entstehen, wurden die Amöben bei Unterbrechung der Züchtungszeit auf verschiedene Weise behandelt. Diese Behandlungen bezogen sich auf die Fragen der Fixierung sowie der bei der elektronenmikroskopischen Präparation gebräuchlichen Auswaschung der Salze mit destilliertem Wasser. Die Behandlung mit destillertem Wasser führte zu einer starken Denaturierung der unfixierten Zellen. Wurden die Amöben auf eine Kollodiummembran aufgebracht, die auf destilliertem Wasser schwamm, so trat auf den Zellen nach einer 30minütigen Behandlung eine starke Vakuolisierung auf, während nach 60 Minuten die so denaturierten Zellen zu Granulen zerfielen. Die in den Zellen befindlichen Makrogranulen sind als selbständige Gebilde in Abb. 2 ersichtlich.

In den weiteren Versuchen wurde die Wirkung der Fixierung (Formalindampf und Osmiumdampf) beobachtet. Die Fixierung mit Formalindampf führte ebenfalls zur Zerstörung der Zellen. Dies geht übrigens gut aus Abb. 3 hervor, wo die Wirkung des Osmium- und des Formalindampfes festgehalten ist. Wie ersichtlich, zerfiel das Protoplasma im Formalindampf. Als eine bessere Fixierungsmethode erwies sich die Behandlung mit Osmiumdampf. Die auf die oben beschriebene Weise gezüchteten Amöben wurden zusammen mit der Kollodiummembran auf den Objektträger des Elektronenmikroskops aufgebracht und auf diesem im nassen Zustand mit Osmiumdampf fixiert. Die als Verunreinigungen vorhandenen Salze werden nach der Fixierung gleichfalls mit Hilfe von destilliertem Wasser durch Dialyse entfernt. In den so hergestellten Präparaten wird ein grosser Teil der Amöben von einer sehr feinen Membran umhüllt. Da diese feine Membran nicht auf jeder einzelnen Amöbe anzutreffen ist bzw. ihre Struktur nicht auf jeder Amöbe gleich ist, liegt die Annahme auf der Hand, dass die Membran in einem gewissen Zusammenhang mit dem physiologischen Zustand der Amöbe steht und sich parallel zu deren physiologischem Zustande verändert (Abb. 9). Darauf lassen zumindest die Membrane mit zerfallener Struktur der Zellen von älteren Kulturen (Abb. 4 und 5) sowie die an den Membranen einzelner Zellen sichtbaren Öffnungen schliessen, die nicht als präformierte Struktur, sondern als funktionell erweiterte Lücken zu deuten sein dürften. Auf diese Struktur hat im Laufe seiner lichtmikroskopischen Untersuchungen bereits auch GELEI hingewiesen [2].

Die mit dem Licht- bzw. Phasenkontrastmikroskop gemachten Beobachtungen werden ferner auch durch die Aufnahmen jener Amöben ergänzt, an denen der Augenblick vor der Klasmatose fixiert wurde. In der Abb. 6 sind die am marginalen Teil der Zelle erscheinenden Granulen von etwa 1 μ Durchmesser zu sehen.

Im Elektronenmikroskop kann, wie bereits oben erwähnt, um zahlreiche Amöben eine Zellmembran von sehr feiner, submikroskopischer Struktur wahrgenommen werden. Diese Zellmembrane folgen dem Umriss der unbestimmten Körperform der Amöben (Abb. 1, 3b, 7, 8 und 9).



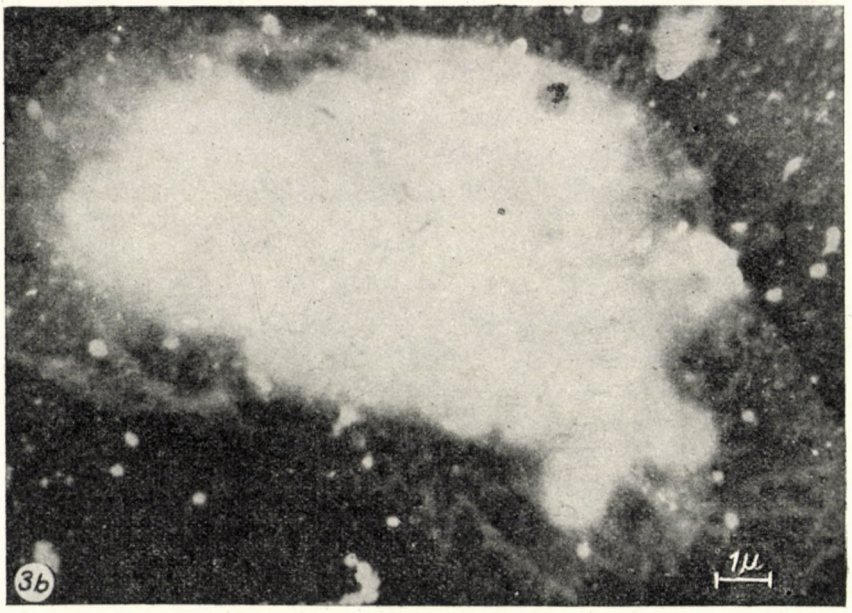
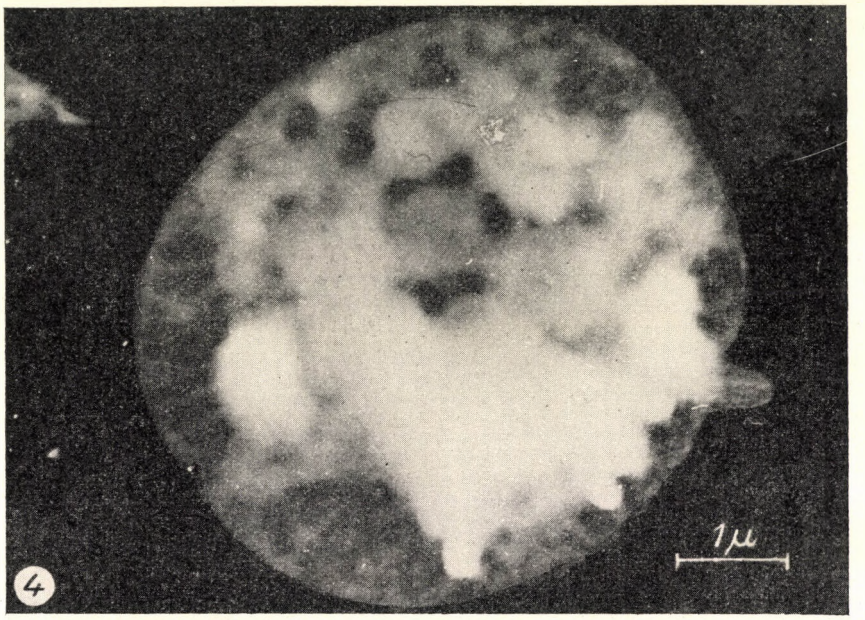


Abb. 3a. Die Wirkung der Fixierung mit Formalindampf. Das Plasma der Amöbe weist starke Risse auf. Unbeschattet. 8000 ×

Abb. 3b. Amöbe. Die Zelle ist undurchleuchtbar. Die Zellmembran folgt dem Umriss der unbestimmten Körperform der Amöbe. Fixierung mit OsO_4-Dampf. Unbeschattet. 6600 ×



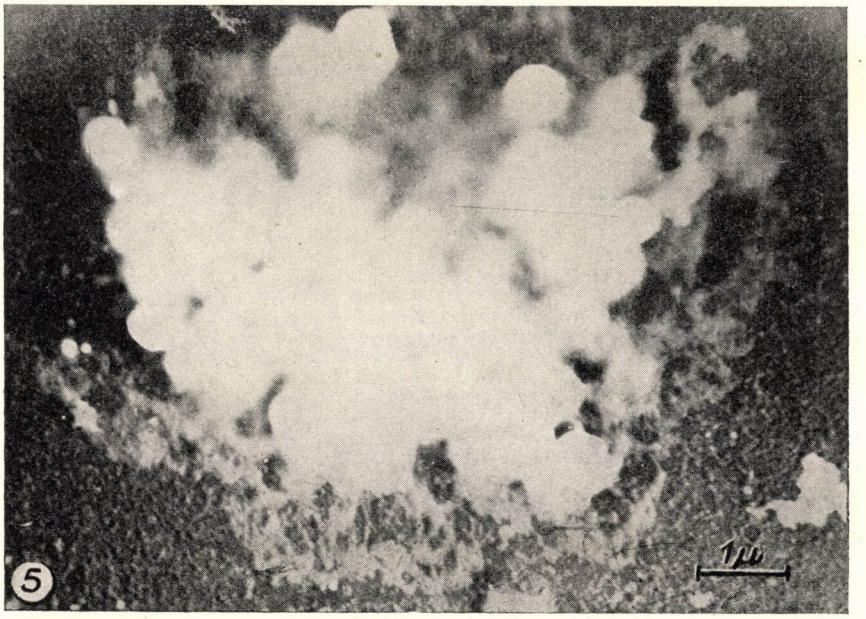


Abb. 4. Zellmembran mit Rissen einer älteren Amöbenkultur. Fixierung mit OsO_4-Dampf. Unbeschattet. 13 800 ×

Abb. 5. Wie Aufnahme Nr. 4. Aus älterer Kultur präparierte Amöbe. Fixierung mit OsO_4-Dampf. Unbeschattet. 12 000 ×

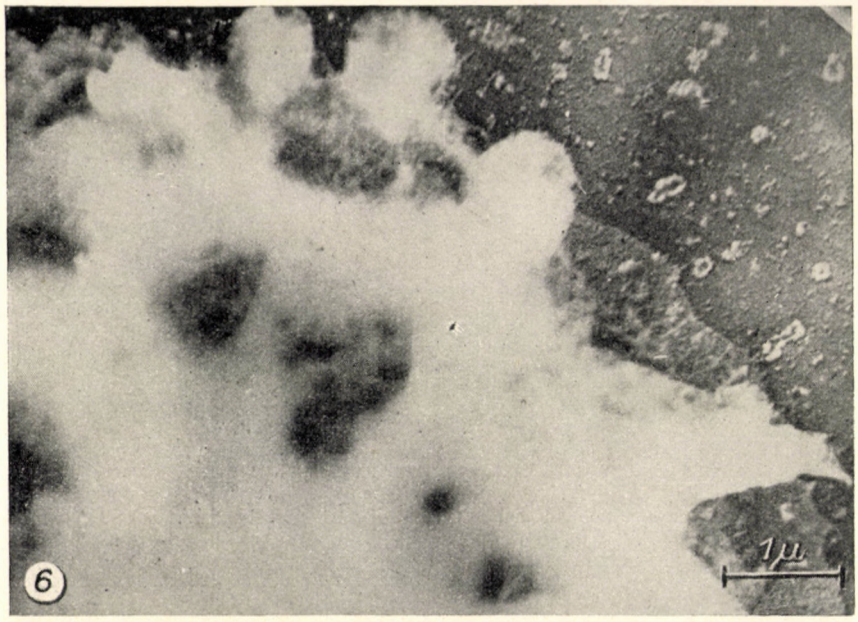
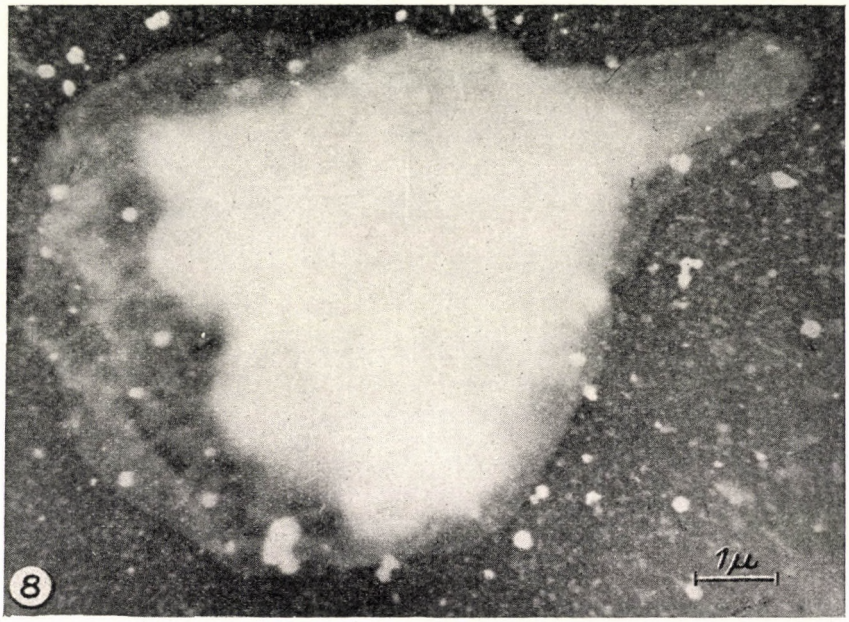
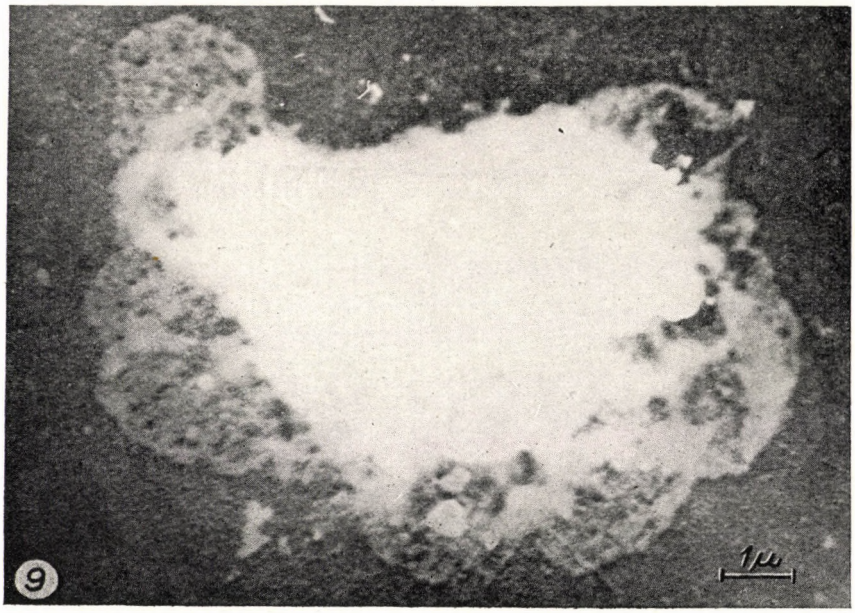


Abb. 6. Teilstück einer Amöbe, fixiert im Augenblick der Klasmatose. Fixierung mit OsO_4-Dampf. Unbeschattet. 15 000 ×

Abb. 7. Phagozytierte Bakterien *(Aerogenes)* innerhalb der Zellmembran. Fixierung mit OsO_4-Dampf. Goldbeschattung. 8000 ×





Amöbe im Augenblick der Fortbewegung. Fixierung mit OsO_4-Dampf. Unbeschattet. 9000 ×

Abb. 9. Amöbe mit retikulärer Struktur der Zellmembran. Fixierung mit OsO_4-Dampf. Goldbeschattung. 9000 ×

Auf Grund der beschriebenen Versuche und der vorgeführten Bilder wurde die Folgerung gezogen, dass die untersuchten Amöben im gegebenen physiologischen Zustand eine Membran von 100 bis 150 Å Dicke besitzen.

Es sei hier J. VADÁSZ für seine wertvollen Ratschläge und seine freundliche Mitarbeit der beste Dank ausgesprochen. Für die systematische Bestimmung der Amöben sind die Verfasser L. VARGA zu Dank verpflichtet.

LITERATUR

1. BAIRATI, A., LEHMANN, F. E. (1953) Structural and chemical properties of the plasmalemma of *Amoeba proteus*. *Exp. Cell Res.*, **5**, 220—233.
2. GELEI, J. (1934) Amöbenforschung und Silbermethoden. *Zool. Anz.*, **108**, 92—122.
3. HAJÓSSI, GY., VADÁSZ, J., GUBA, F. (1954) Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Zellenkulturen mit modifizierter Präparationstechnik. *Acta Morph. Hung.*, **4**, 545—549.
4. DOFLEIN, F., REICHENOW, E. (1953) Lehrbuch der Protozoenkunde. Fischer, Jena.

СУБМИКРОСКОПИЧЕСКАЯ КЛЕТОЧНАЯ ОБОЛОЧКА У *ENDAMOEBA BLATTAE* BÜTSCHLI

Авторы культивировали или же содержали при жизни амёбы в питательной среде на сплавной пленке коллоидия, питая их диффузионным способом. Прекращая срок культивирования, они фиксировали амёбы *(Endemoeba blattae* BÜTSCHLI) при помощи осмиевого пара. В электронном микроскопе авторы наблюдали вокруг амёб клеточную оболочку толщиной в 100—150 Å.

SUBMICROSCOPIC CELL-MEMBRANE OF *ENDAMOEBA BLATTAE* BÜTSCHLI

Amoebae fed with the diffusion method were grown, respectively kept alive on collodium membrane floated on culture medium. Interrupting the culture period, the amoebae *(Endamoeba blattae* BÜTSCHLI) were fixed with osmium vapour. Under the electron microscope a cell membrane of 100 to 150 Å could be observed around the amoebae.

GYÖRGYI HAJÓSSI, Budapest, VIII., Puskin u. 9, Ungarn
FERENC GUBA, Budapest, VIII., Puskin u. 9, Ungarn

REIZPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN ZILIATEN

IV. ÜBER DAS EMPFINDUNGS- BZW. REAKTIONSVERMÖGEN VON *PARAMECIUM*

B. PÁRDUCZ

UNGARISCHES NATURWISSENSCHAFTLICHES MUSEUM, BUDAPEST (VORSTAND: I. BOROS)

(Eingegangen am 17. Mai 1955)

Zusammenfassung

Bei paralleler Anwendung des Osmium-Hämatoxylin-Schnellfixierungsverfahrens und experimenteller Lebenduntersuchungen wurden am *Paramecium* einige Prinzipien der JENNINGS-schen, bei den Einzellern und im Bereich der chemischen, mechanischen und thermischen Reizarten allgemein anerkannten Theorie der Raumorientierung überprüft.

Im Gegensatz zu den Grundpostulaten der Versuchs- und Irrtumstheorie wurde folgendes festgestellt:

Die als abgekürzte Varianten der Fluchtreaktion angesehenen Reizbewegungen sind in Wirklichkeit auf verschiedenen selbständigen Zilienmechanismen beruhende Bewegungsänderungen, die nichts mit dem JENNINGS'schen sog. »*motor-reflex*« gemein haben.

Ausser den obigen Reizbewegungen stehen dem *Paramecium* zur Beantwortung der Reize auch noch zahlreiche andere Bewegungsmöglichkeiten zur Verfügung, so dass die Fluchtreaktion nicht die einzig mögliche, ja nicht einmal die häufigste Methode der Orientierung im Reizfeld darstellt.

Diese kurzen Einstellbewegungen zeigen in ihrem Ablauf eine bestimmte Beziehung zu der Lokalisation des Reizes, doch sind sie nicht dauernd gerichtet.

Aus der grossen Mannigfaltigkeit der Bewegungsmöglichkeiten lässt sich auf eine weit höhere Entwicklungsstufe der Reizbarkeit von *Paramecium* schliessen, als bisher angenommen wurde; die Zilientätigkeit kann sich nämlich infolge lokaler Reizwirkungen auch lokal, ja sogar gleichzeitig in den verschiedensten Bezirken der Körperoberfläche in mannigfaltigster Weise ändern.

Im Aktionssystem von *Paramecium* ist also nach den obigen Ausführungen nur die typische, aus drei Phasen zusammengesetzte JENNINGS'sche Fluchtreaktion als wirkliche Probierbewegung anzusehen, so dass die Überprüfung der auf ihren Ablauf und auf den Auslösungsmechanismus bezüglichen früheren, grösstenteils auf der subjektiven Beobachtung des Protistenkörpers als ganzes beruhenden Feststellungen als eine besonders aktuelle Aufgabe erscheint.

Es ist gerade ein halbes Jahrhundert her, dass JENNINGS die Grundlagen für unsere heutige Auffassung über die Reizbarkeit der Protisten bzw. über die Gesetzmässigkeiten ihres raumorientierten Verhaltens niederlegte. Um die Jahrhundertwende erschienen in rascher Folge seine aufsehenerregenden Mitteilungen [10—17], in denen er gewisse Beobachtungen früherer Forscher, hauptsächlich ENGELMANNS [7] ergänzte und vertiefte und den verwickelten Fragenkomplex der Reizerscheinungen der niederen Organismen von einer ganz neuen Seite beleuchtete. Seit seinen bahnbrechenden Untersuchungen steht eine, aus drei Phasen zusammengesetzte Bewegungsreaktion im Vordergrund der vergleichenden reizphysiologischen Forschungen. JENNINGS fand nämlich im Laufe seiner an den verschiedensten Untersuchungsobjekten vorgenommenen

Beobachtungen, dass der einzellige Organismus auf jede ungünstige Veränderung seiner Umgebung — unabhängig von der Art des Reizes, von dessen Angriffspunkt oder von dem Umfang der gereizten Körperfläche — mit der gleichen bestimmten Folge von Bewegungen antwortet: er fährt zurück (mit dem Hinterende voran), führt eine Wendung um sein Hinterende aus und schwimmt schliesslich in der so gegebenen Richtung wieder vorwärts.

Der Ablauf dieser sog. *Fluchtreaktion (»avoiding reaction«, »Schreckreaktion«, »Unterschiedsreaktion«)* tritt uns mit schematischer Klarheit besonders bei den kriechenden Infusorien, z. B. bei *Oxytricha* entgegen (s. die Bewegungsstellungen 2—5 in Abb. 1).

Laut JENNINGS besteht die charakteristische Eigenschaft dieser auf Reizwirkungen allerlei Art mit monotoner Gleichförmigkeit gegebenen Bewegungsantwort darin, dass sie relativ zur Reizquelle *eigentlich ungerichtet ist.* Es trifft zwar zu, dass sich der Körper mit seinem Vorderende in der zweiten Phase der Reaktion in der Regel mehr oder weniger von der Reizquelle wegdreht, doch wird die Richtung der Verdrehung der Körperachse *nicht durch äussere*, sondern ausschliesslich durch innere Faktoren, durch die speziellen Symmetrieverhältnisse des betreffenden Protistenkörpers bzw. durch die morphologischen oder funktionellen Eigentümlichkeiten des lokomotorischen Apparates bedingt. *Oxytricha* dreht sich z. B. — an welchem Punkte ihres Körpers auch immer sie der Reiz trifft — nach dem Zurückfahren stets nach rechts. Wenn also der unangenehme oder gefährliche Reiz die rechte Seite des Körpers trifft, dann dreht sich das Tier als Folge der Reaktion geradewegs in die schädliche Reizzone ein. Zieht man jedoch in Betracht, dass der sich nach vorne fortbewegende Einzeller naturgemäss mit seinem Vorderende mit den Einflüssen seiner Umgebung in Berührung kommt, so bedeuten die ersten zwei Phasen des ausgelösten Bewegungskomplexes, nämlich das Zurückschwimmen und die Seitendrehung nach rechts, für das Tier gewöhnlich die Rettung. Ist indessen die Ausdehnung der Reizzone so gross, dass das Wegdrehen nicht zur Rettung genügt, so wiederholt sich die Fluchtreaktion solange, bis eine der automatisch angenommenen neuen Achsenstellungen *zufällig* von der Reizquelle wegführt (s. die Bewegungsstellungen 1—14 in Abb. 1).

An Hand des Beispiels seines hauptsächlichen Untersuchungsobjektes, des *Paramecium*, war es gleichfalls JENNINGS, der darauf hinwies, dass auch die pelagischen, gewöhnlich entlang einer Schraubenbahn frei schwimmenden Infusorien dem Wesen nach durch das gleiche elementare Handeln aus der Gefahr herausgebracht werden. Zur Vermeidung fester Hindernisse oder von Gebieten mit schädlicher Temperatur oder Zusammensetzung steht nämlich auch dem *Paramecium* bloss eine einzige Reaktionsmethode zur Verfügung: es schwimmt zurück, sein Vorderende biegt sich seitlich aus, worauf es dann aus dieser Körperlage ausgehend wieder seine normale Vorwärtsbewegung aufnimmt (Abb. 2).

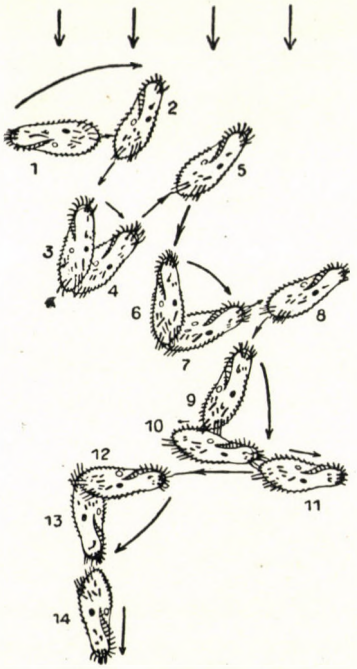


Abb. 1. Mechanismus der Beantwortung eines einseitig, aus der Richtung der parallelen Pfeile wirkenden, diffusen thermischen Reizes bei *Oxytricha fallax* durch mehrmalige Wiederholung der an sich ungerichteten Fluchtreaktion (2—6). Die zwischen die verschiedenen Körperstellungen (1—14) eingezeichneten Pfeile bezeichnen die Bewegungsrichtung des Tieres (nach JENNINGS)

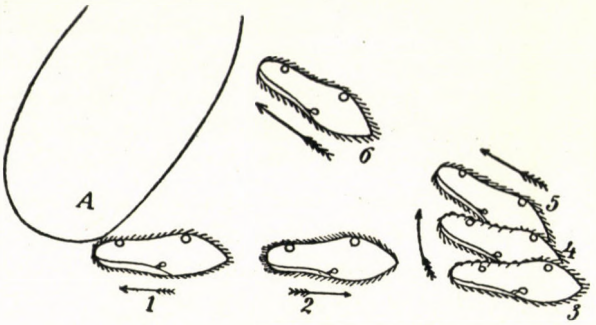


Abb. 2. Schematische Darstellung der Fluchtreaktion von *Paramecium*. *A:* Umriss eines festen Körpers oder einer anderen Reizzone. 1—6: Folge der angenommenen Körperstellungen. Die gleichzeitige Rotation des Tieres um die Längsachse ist nicht angedeutet (nach JENNINGS)

Abb. 3. Schematische Darstellung der linksgewundenen normalen Bewegungsbahn von *Paramecium*. Die punktierte Gerade bezeichnet die Achse der Schraubenbahn

Dieses einfache Schema der stereotypen Reizbeantwortung wird aber hier bereits durch zwei Umstände etwas kompliziert. Der eine Umstand besteht darin, dass das *Paramecium* während seiner normalen Ortsveränderung sowie während der Ausführung der Reaktion auch um seine Längsachse rotiert. Hierauf ist es zurückzuführen, dass — obwohl die Ausbiegungsrichtung des Vorderendes auch in diesem Falle unabhängig vom Angriffspunkt des Reizes und *lediglich morphologisch* bestimmt (aboral) ist — in der zweiten Phase der Reaktion (Abb. 2, 3—5) aus dieser einseitigen Achsendrehung hier, gleichfalls automatisch, eine Trichterbewegung des Vorderendes, d. h. eine Reihe von verschiedenen Körperstellungen zustande kommt. Diese Überproduktion von neuen Körperstellungen und andererseits die sich unverändert fortsetzende Strudeltätigkeit der peristomalen Wimpern trägt nun nach der Deutung von JENNINGS wesentlich dazu bei, dass die Wirksamkeit der an sich ungerichteten Fluchtreaktion eine Steigerung erfährt. — Um seinen Gedankengang besser verfolgen zu können, muss hier kurz das vielumstrittene Problem der Zilienmechanik der Fluchtreaktion gestreift werden, dessen Klärung bzw. Ableitung von der normalen Wimpertätigkeit ebenfalls von JENNINGS an Hand von *Paramecium* versucht wurde.

Die linksgewundene Schraubenbahn des in einer vom Gesichtspunkt der Reize homogenen Umgebung vorwärtsschwimmenden *Paramecium* (Abb. 3) wird nach ihm von drei Faktoren, nämlich von der Vorwärtsbewegung, von der Drehung um die Längsachse und von der ständigen Ausbiegung des Vorderendes aus der Schraubenachse bedingt. Jeder dieser Faktoren beruht auf einer bestimmten Besonderheit im Schlage der Wimpern. Der erste und zweite darauf, dass die Zilien vorwiegend rückwärts bzw. richtiger: schräg nach rechts hinten schlagen. Demgegenüber schlagen die Wimpern des Peristomalfeldes immer kräftiger als die der übrigen Körperfläche, wobei ihre Strudelwirkung fast genau kaudal gerichtet ist. Dies hat zur Folge, dass das Vorderende des Tieres aus der Richtung der Schraubenbahnachse dauernd nach der aboralen Seite abgetrieben wird. Diese einseitige Ausbiegung wird durch die gleichzeitige Rotation des Körpers zu einer kontinuärlichen Kegelschwingung ausgezogen, bzw. das Vorderende beschreibt während der Vorwärtsbewegung des Körpers eine Schraubenlinie, wobei die Ventralseite ständig nach innen gekehrt ist.

Nach der Deutung von JENNINGS kommt nun die Fluchtreaktion in der Weise zustande, dass sich diese normale Wimpertätigkeit auf jedwede Reizwirkung in einer im voraus bestimmten Weise und Folge ändert. Die erste Phase, das Zurückschwimmen, wird einfach durch die Umkehrung der ursprünglichen Schlagrichtung des Wimperkleides bewirkt (Abb. 2, 1—3). Die zweite, nach Beendigung des Zurückschwimmens eintretende Phase der Reaktion kann auf eine besondere physiologische Eigenschaft einer topographisch bestimmten Gruppe der lokomotorischen Organellen zurückgeführt werden. Die Wimpern der linken Körperseite kehren nämlich während dieser Phase der Reaktion ihre

Schlagrichtung um, u. zw. konsequent immer um 90 Grad. Infolgedessen richtet sich auch ihre Strudelwirkung von nun an anstatt nach rechts hinten nach links hinten, also gegen das Peristomalfeld zu. Die rotatorische Komponente ihrer Schlagtätigkeit wirkt dann der Achsendrehung des Körpers nach links entgegen und verstärkt gleichzeitig die schon für die normale Bewegung charakteristische Ausbiegung nach der aboralen Seite. Als Endergebnis schwingt also das vordere Ende in einem grösseren Kreise aber mit verminderter Geschwindigkeit herum, d. h. die Körperachse stellt sich nacheinander in verschiedene Richtungen ein (Abb. 2, 3—5).

JENNINGS weist darauf hin, dass der Schlag der Peristomalwimpern auch während dieser Kegelschwingung des Tieres einen ständigen Wasserstrom der Mundgrube zustrudelt. Auf diese Weise erhält das *Paramecium* nacheinander aus verschiedenen Richtungen »Proben« des gerade vor ihm befindlichen Wassers. Solange nun diese etwas von der Reizursache enthalten, hält sich das Tier zurück und führt nur mit seinem Vorderende die erwähnte kreisende Bewegung aus, es »probiert«. Sobald nun die Probe aus einer bestimmten Richtung nichts mehr von der Reizursache enthält, nimmt das Tier einfach wieder seine Vorwärtsbewegung in dieser reizlosen Richtung auf (Abb. 2, 5—6). — Obwohl also auch hier die Ausbiegungsrichtung des Vorderendes in keiner Beziehung zum Orte der Reizung steht, so ermöglicht es dennoch die Ausziehung dieser aboralen Abschwenkung zu einer Kegelschwingung sowie die erwähnte gleichzeitige Sondierungstätigkeit der Peristomalziliatur, dass die aufs neue einsetzende geradlinige Vorwärtsbewegung bis zu einem gewissen Grade richtig orientiert ist. So ist es denn in den meisten Fällen gar nicht notwendig, die zweite, von *Oxytricha* noch ausschliesslich angewandte Methode des Probierens, nämlich die mehrmalige Wiederholung der vollen Reaktion, in Anspruch zu nehmen, damit das *Paramecium* der unangenehmen Reizquelle ausweichen könne.

Nachdem JENNINGS eine aus drei Phasen bestehende und derjenigen der *Paramecien* völlig ähnliche Fluchtreaktion auf die verschiedenartigsten Reize bei einer ganzen Reihe von Einzellern und — neben anderen Reaktionsarten — auch bei zahlreichen Metazoen beobachtet hatte, konnte er in seiner klassischen Arbeit [18], gestützt auf ein in seiner Art einzig dastehendes Vergleichsmaterial, seine Schlussfolgerungen für die Protisten wie folgt formulieren:

Der Organismus des Einzellers ist nicht imstande, einen Unterschied zwischen den in seinem täglichen Leben vorkommenden Reizen (also mechanischen, chemischen, Temperatur- und Lichtreizen) zu machen. In ähnlicher Weise können aber auch die Teile des Organismus nicht die räumlichen Unterschiede der Intensitäten ein und derselben Reizart perzipieren. Der primitive Zustand ihrer Organisation ermöglicht bloss die ursprünglichste Form der Reizbarkeit: als Reiz wirkt ausschliesslich der Übergang von günstigen zu weniger günstigen Bedingungen, also eine zeitliche Differenz verschiedener Reizwerte. Aus der Unempfindlichkeit der einzelligen Organismen für Unter-

schiede der Reizung gegenüberliegenden Flanken folgt zwingend, dass der Protistenkörper auf jegliche Art von Reizwirkung nur als ganzes, und entsprechend seinen strukturellen Gegebenheiten nur mit einem einzigen, sich nach einem starren Schema ablaufenden Bewegungskomplex, nämlich mit der Fluchtreaktion, antworten kann. Der richtig orientierte Zustand des Tieres kann demnach nur das zufällige Produkt der blinden Wiederholung dieser an sich ungerichteten negativen Reaktion, also das Ergebnis einer langwierigen Probiermethode (»method of trial and error«, »Versuchs- und Irrtumsmethode«) darstellen. Seine Auffassung rundete er mit der Feststellung ab, dass der einzellige Organismus eigentlich keine wahre positive Reaktion aufweist, weil auch diese per exclusionem, indirekt, als ein sekundäres Ergebnis von negativen Bewegungsantworten zustande kommen. Das Tier vermag von der optimalen, richtiger gesagt, von der vom Gesichtspunkt der Reize indifferenten Richtung einfach deswegen nicht abzuweichen, weil jede Abweichung notwendigerweise als Reiz wirkt und sogleich mit der Fluchtreaktion beantwortet wird.

Die hier geschilderte Theorie von JENNINGS richtete sich bekanntlich gegen die sog. *Tropismenlehre* von LOEB [21, 22], der unter völliger Ignorierung der speziellen Struktur und des augenblicklichen physiologischen Zustandes der Organismen den zwangsläufigen Ablauf und den vollständig mechanischen Charakter des Orientierungsprozesses hervorhob. Nach ihm wird die gerichtete Bewegung bzw. Krümmung jedes Tieres oder jeder Pflanze durch die unmittelbare Lokalwirkung des Reizes ausgelöst, wobei sich Tier und Pflanze als Spielzeuge von äusseren Kräften so unvermeidlich und unbeholfen nach der Reizquelle richten wie die Magnetnadel nach dem Eisen.

Das Buch von JENNINGS bildete den Beginn einer sich lange hinziehenden Diskussion zwischen den Anhängern der beiden Auffassungen. Eine umfangreiche Literatur wies gegenseitig auf die Schwächen oder geradezu auf die Unhaltbarkeit der gegenteiligen Auffassung hin und versuchte, jedes Orientierungsverhalten entweder in das Schema des Tropismus oder in das der Versuchs- und Irrtumstheorie hineinzupressen.

Dieser verwickelte Fragenkomplex der Raumorientierung wurde von mehreren ausgezeichneten Facharbeiten in jeder Beziehung erschöpfend behandelt und die wichtigeren diesbezüglichen Feststellungen sind in jedem Lehrbuch der allgemeinen Biologie enthalten. Dieser Umstand lässt es als überflüssig erscheinen, hier eine eingehendere Zusammenfassung des heutigen Standes der Forschungen über die Reizbarkeit der Einzeller bzw. über ihren Orientierungsmechanismus in einem Reizfeld zu geben. Es sei nur kurz darauf hingewiesen, dass es allem Anschein nach gelungen ist, die sich gegenüberstehenden Auffassungen auf einen gemeinsamen Nenner zu bringen [20]. In diesem Sinne ist der einzellige Organismus auch gegenüber den räumlichen Unterschieden der Intensitäten gewisser Reize (Schwerkraft und elektrischer Strom) empfindlich. Nach KÜHN werden heute die obigen, relativ zur Reizquelle dauernd gerichteten

Bewegungsreaktionen der frei beweglichen Organismen im allgemeinen unter dem Sammelnamen »Topotaxis« zusammengefasst. Hierbei wird das Wenige, das sich aus der LOEBschen Lehre vom Tropismus als dauernd erwiesen hat, in diesen Begriffskreis eingebaut. Gleichzeitig herrscht aber unverändert die Ansicht vor, dass im Bereich der übrigen Umwelteinflüsse nur der zeitliche Wechsel der Reizstärke als Anlass zu Bewegungsänderungen in Frage kommt und dass der Übergang in andere Reizbedingungen nur richtungsändernd, aber nicht steuernd wirkt. Das scheinbar raumorientierte Verhalten tritt hier mit Hilfe der JENNINGSschen Fluchtreaktion, nach dem Prinzip vom »Versuch und Irrtum« ein (Phobotaxis). Gleichzeitig wird auch betont, dass die phobischen und topischen Reaktionen im Leben des Tieres oft eng miteinander verknüpft sind. Sogar ein und derselbe Reiz (z. B. die Schwerkraft bei *Paramecium*) wird je nach den Begleitumständen das eine Mal phobisch und das andere Mal topisch beantwortet.

Wie hier gezeigt worden ist, zeitigte die Forschungsgeschichte des Verhaltens bei den Einzellern bis heute keine grossen Änderungen. Nach Ausschluss der ökologisch weniger wichtigen Reizarten dominiert hier unverändert die Phobotaxis, die auch nach den Lehr- und Fachbüchern im täglichen Leben der Einzeller die fast ausschliessliche Art des Reagierens darstellt [8]. Andererseits erscheinen Jahr für Jahr Abhandlungen, die die stammesgeschichtliche Entwicklung des Empfindungs- bzw. Reaktionsvermögens darlegen wollen und hierbei meistens von der Fluchtreaktion der Einzeller als der ursprünglichsten Erscheinungsform der Reizerscheinungen ausgehen, wobei sie deren physiologischen Mechanismus unverändert bei Berufung auf die Untersuchungen von JENNINGS am *Paramecium* erklären.

Nach all dem müsste man also glauben, dass die Versuchs- und Irrtumstheorie — im Gegensatz zur Lehre vom Tropismus — die Angriffe eines halben Jahrhunderts erfolgreich überdauert hat und dass sie innerhalb des von KÜHN umrissenen Rahmens einen der Eckpfeiler der Biologie darstellt, auf den man sich bei der Erforschung der verwickelten Probleme der Reizphysiologie mit Sicherheit stützen kann.

Nach gründlicher Durchsicht der einschlägigen Literatur stellt es sich jedoch heraus, dass eine solche Folgerung noch verfrüht ist. Die Wahrheit ist nämlich, dass es bis heute noch nicht gelungen ist, die von den Gegnern JENNINGS' seit ALVERDES [1, 2] vorgebrachten Argumente zu widerlegen. Zahlreiche Forscher betonen auch heute noch unverändert, dass JENNINGS seine auf *Paramecium* bezüglichen Forschungsergebnisse grundlos verallgemeinert hat, dass er die Reizbewegungen allzu mechanistisch auffasst und dass auch den Einzellern Bewegungsantworten zur Verfügung stehen, die nichts mit der Fluchtreaktion gemeinsam haben. Diese protestierenden Stimmen verhallten aber wirkungslos.

Manche der hier berührten Fragen sind offentsichtlich auch in bezug auf die allgemeine Zellphysiologie von prinzipieller Bedeutung. Ihre Erklärung,

bzw. der entgültige Abschluss der ganzen Diskussion wurde aber bisher vor allem durch den Umstand verhindert, dass bei den Einzellern der eigentliche Mechanismus der Reizbewegungen — vielleicht mit Ausnahme der Galvanotaxis — selbst heute noch nicht bekannt ist [19]. Wie die Reaktion zustande kommt — und das ist besonders zu betonen —, darüber sind selbst bei *Paramecium* nicht mehr als undeutliche Vorstellungen vorhanden. Die diesbezüglichen, oben kurz geschilderten Feststellungen JENNINGS' können sich nämlich grösstenteils nur auf die subjektive Beobachtung der Bewegungsänderungen des Ziliatenkörpers als ganzes stützen, und die auf jeden Fall wünschenswerte Überprüfung seines Erklärungsversuches stiess bisher stets auf unüberwindbar erscheinende methodische Schwierigkeiten.

Die Zielsetzung der vorliegenden Untersuchungen war, die Reizbarkeit bzw. das »scheinbar« raumorientierte Verhalten der Einzeller gegenüber den repulsiv wirkenden mechanischen, chemischen und thermischen Reizen näher zu beleuchten. Hirbei ging das Bestreben besonders dahin, auch bezüglich der feineren, in der Tätigkeitsveränderung der lokomotorischen Organellen selbst zum Ausdruck gelangenden Einzelheiten der Bewegungsreaktionen zu einigen zuverlässigen Angaben zu gelangen.

Angesichts seiner überragenden Rolle in den bisherigen reizphysiologischen Forschungen wurde als Versuchsobjekt der auch von JENNINGS am eingehendsten untersuchte Einzeller, das *Paramecium*, gewählt.

Die Versuchs- und Irrtumstheorie stützt sich — wie zu sehen war — im Wesen auf drei aus einander folgenden bzw. sich gegenseitig voraussetzenden Feststellungen. Die erste ist die Feststellung einer primitiven Entwicklungsstufe der Reizbarkeit, die keine lokale Beeinflussung des lokomotorischen Apparates zulässt. Die zweite ist die des Uniformitätscharakters der überhaupt auslösbaren Bewegungsantworten, die sämtliche Bewegungsorganellen des Körpers immer gleichartig in Anspruch nehmen und daher relativ zur Reizquelle ungerichtet sind. Die dritte ist die der Anwendung eines Probierverfahrens bei dem Orientierungsprozess, d. h. einerseits die Einnahme von zahlreichen, aber nur morphologisch bestimmten neuen Körperstellungen entweder während einer einzigen Reaktion oder durch deren mehrmaligen Wiederholung und andererseits die Wahl einer dieser Körperstellungen durch Selektion.

Der besseren Übersichtlichkeit halber werden die hier zu schildernden Untersuchungsergebnisse nach den obigen drei grundlegenden Sätzen der Versuchs- und Irrtumstheorie gruppiert, wobei zu bemerken ist, dass hier auf die zur Überprüfung des dritten Satzes angestellten Lebenduntersuchungen nicht eingegangen werden soll. Es sei nur kurz darauf hingewiesen, dass das Verhalten des Tieres selbst im Falle der in der typischen Form ablaufenden Fluchtreaktion meistens mit den Anforderungen der Probierungsmethode unvereinbar ist. Solche Feststellungen können sich aber ebenfalls nur auf die subjektive Beobach-

tung der ausgeführten Bewegungsänderungen des ganzen Organismus stützen, so dass sie allein für sich keine überzeugende Beweiskraft besitzen.

Auf den ersten Blick ist unsere Aufgabe bereits wesentlich leichter, wenn die weiter oben an zweiter Stelle erwähnte Feststellung von JENNINGS, der stereotype Charakter der Reizbeantwortung, überprüft werden soll.

Wird nämlich das Verhalten der sich in ihrer natürlichen Umgebung oder im freien Tropfen herumtummelnden Paramecien vorurteilslos beobachtet, so findet man, dass sie die festen Gegenstände oder die Gebiete mit unangenehmer Temperatur bzw. ungeeigneter chemischer Zusammensetzung nicht so sehr durch mehrmalige Wiederholung der starren Fluchtreaktion vermeiden, als eher mit Hilfe von bestimmten, der jeweiligen Situation angepassten einmaligen Richtungsänderungen. Das Tier weicht also nach der Berührung mit dem unangenehmen Reizmittel durch die Verbiegung seiner Bewegungsbahn, durch eine völlige Umdrehung seiner Körperachse, durch die Abwendung seines Vorderendes usw. einfach vor der Reizquelle aus, um danach seine normale Schraubenbewegung fortzusetzen.

Diese kurze und im Gegensatz zur Fluchtreaktion sich allem Anschein nach im Verhältnis zum Reizfelde direkt gerichtete Vermeidungsreaktionen wurden bereits von zahlreichen Forschern beobachtet, wobei sich einige von ihnen gerade auf diese Bewegungsänderungen beriefen, als sie auch die JENNINGSsche Erklärung für die Raumorientierung selbst in Zweifel stellten.

JENNINGS hatte allerdings die der Versuchs- und Irrtumstheorie von dieser Seite drohenden Angriffe schon von vornherein mit der Feststellung abgewehrt, dass die betreffenden Reizbewegungen als radikal abgekürzte Varianten der Fluchtreaktion anzusehen sind. Laut seiner Beobachtungen kann nämlich die erste der drei Phasen der vollständigen Reaktion, die Rückwärtsbewegung, je nach den Umständen verschieden lang dauern oder sogar auch völlig ausbleiben. In diesem Falle besteht die Beantwortung des Reizes nur in einer langsamen Kegelschwingung des vorderen Körperendes. Der Öffnungswinkel dieses Rotationstrichters kann grösser oder kleiner sein, je nachdem wie gross der links vom Peristomrande gelegene Wimperbezirk ist, der seine Schlagrichtung verändert. Im Falle einer Kegelschwingung mit kurzem Durchmesser — betont JENNINGS — wird der flüchtige Betrachter leicht das kreisförmige Schwingen des Vorderendes und die Drehung um die Längsachse übersehen und zur Folgerung geneigt sein, dass er das unmittelbare Abwenden des Tieres von der Reizquelle beobachtet hat.

Doch auch die Trichterbewegung des vorderen Körperendes kann eine längere Zeit andauern oder sich dermassen verkürzen, dass von der zweiten Phase nur die Abweichung nach der aboralen Seite verbleibt. In diesem Falle hebt die nach links hinten gerichtete Strudeltätigkeit des links vom Peristomalfeld befindlichen Zilienkleides völlig die normale Tätigkeit der übrigen Körperzilien auf. Je nachdem, wie lange diese funktionelle Trennung der Wimper-

tätigkeit andauert, kann ihr Ergebnis in einer kurzen Abwendung des vorderen Körperendes, in einer Umkehr des Körpers um volle 180 Grad oder in extremen Fällen in einer Kreisbewegung des Vorderendes um das Hinterende in einer Ebene bestehen. Die Erklärung für alle diese Modifikationen ist nach ihm darin zu suchen, dass das Vorderende schon nach der ersten bzw. schon nach einigen wenigen neuen Achsenstellungen die reizfreie Richtung gefunden hat, wonach dann das Tier, ohne das volle, fix festgelegte Programm der Fluchtreaktion absolvieren zu müssen, seinen Weg unbehindert fortsetzen kann. Als überzeugenden Beweis für die Richtigkeit seiner Deutung betrachtet er die Tatsache, dass die Richtung der Achsenabweichung selbst im Falle dieser kurzen Reaktionen ausnahmslos aboral ist.

Dadurch also, dass jede der drei Phasen der Fluchtreaktion übermässig stark ausfallen bzw. sich auf ein kaum wahrnehmbares Minimum reduzieren kann, sollen nach JENNINGS die scheinbar andersartigen negativen Reaktionen zustande kommen. Im Laufe der späteren Untersuchungen stellte es sich allmählich heraus, dass er mit dieser geistreichen Erklärung jeden seiner Kritiker in eine ziemlich schwierige Lage versetzt hatte. Vergebens berief sich z. B. ALVERDES [1, 2] darauf, dass die Abwendung des vorderen Körperendes nicht nur dorsal, sondern nach jeder beliebigen Körperseite erfolgen könne. Er vermochte diese Behauptung nicht überzeugend zu beweisen, und die Fachliteratur ging einfach über sie hinweg. Infolge des ausserordentlich schnellen Ablaufes der erwähnten Reaktionen ist es im gegebenen Falle in der Tat fast unmöglich festzustellen, ob die wahrgenommene Abweichung der Körperachse eine selbständige Reizbewegung darstellt oder bloss eine Teilhandlung des Komplexes der vollen Fluchtreaktion. Es ist offenbar, dass die Entscheidung dieser Frage lediglich von der endgültigen Klärung des grundlegenden Zilienmechanismus der betreffenden Bewegungsreaktionen erwartet werden darf.

Zu diesem Zwecke wurde unlängst die bei der Erforschung der normalen Zilientätigkeit [29] bereits wohlbewährte Methodik, das mit Lebenduntersuchungen kombinierte Osmium-Hämatoxylinverfahren [26] herangezogen. Es gelang denn auch an Paramecien, die vorher thermischen, mechanischen bzw. chemischen Reizwirkungen ausgesetzt wurden, mit Hilfe dieser Schnellfixierungstechnik metachronische Zilienwellen zu stabilisieren, die den verschiedenen Stadien der eben ausgeführten Reizbewegungen entsprachen [28]. Einige interessantere Typen der durch die Auswertung und Identifizierung dieser fixierten »Momentaufnahmen« erhaltenen Bewegungsreaktionen sollen hier im nachstehenden geschildert werden.

1. *Einfache Vermeidungsreaktionen.* Die häufigste Antwort des Tieres auf eine leicht unangenehme Reizwirkung ist, dass es seine regelmässige linksschraubige Bewegungsweise plötzlich unterbricht und sich in einem kleineren Winkel von der Reizzone abwendet. Geht man von der von JENNINGS angenommenen Reizbarkeit des *Paramecium* aus, so lassen sich diese während der

Fortbewegung und in beliebiger Richtung eintretenden Bewegungsänderungen offensichtlich nicht erklären. Ihr Auftreten dürfte vermutlich das Ergebnis davon sein, dass an der gerade der Reizwirkung ausgesetzten Körpergegend der Rhythmus des Zilienschlages momentan rascher wird oder dass sich die wirksame Schlagrichtung verändert. Infolgedessen wird ein kurzer, in die Reiznähe fallender Abschnitt der schraubenförmigen Bewegungsbahn gleichsam in die Länge gezogen. Tatsächlich erhält man häufig an den Fixationspräparaten anstatt der in regelmässigen und gleichförmigen Abständen verlaufenden linksgewundenen Zilienwellen der ungestörten Normalbewegung (Abb. 4) fallweise an verschiedenen Seiten der Körperfläche, in der Regel jedoch an der vorderen Körperhälfte, ein Zilienwellenmuster, das in bezug auf die trennenden Zwischenräume bzw. den Steigwinkel auffallend vom Normalen abweicht (Abb. 5—9). Diese Bilder unterstützen in überzeugender Weise die theoretischen Darlegungen von BOZLER [4], in denen er die Entstehung der sog. »negativen Thigmotaxis« erklärt. Sie stellen aber gleichzeitig auch ein Zeugnis dafür dar, dass die momentane Störung des Erregungsgleichgewichtes zwischen den reiznäheren und antagonistischen Körperseiten nicht nur nach dem Anstossen an irgendein Hindernis, sondern auch als Folge von andersartigen — in unserem Falle wahrscheinlich von einseitigen chemischen — Reizwirkungen eintreten kann.

2. *Bogenschwimmen unter Rotation.* Diese recht häufig wahrnehmbare und bereits auch von ALVERDES [2] und DEMBOWSKI [6] beschriebene Bewegungsweise offenbart sich darin, dass sich das Tier bei Einhaltung seiner schraubenförmig gewundenen Bahnform in einem regelmässigen flachen Bogen seitwärts von der unangenehmen Reizzone abdreht. Auf eine leicht demonstrierbare Modifikation dieses Vermeidungsbogens hatte schon BOZLER [4] hingewiesen. Nach seinen Beobachtungen werden nämlich geotaktisch aufsteigende Paramecien, wenn sie an eine schräge Glaswand stossen, von dieser zurückgeworfen, worauf sie sich dann unter Rotation um ihre Körperachse in einem schönen Bogen wieder in die senkrechte Richtung zurückwenden. Nach einem neuen Anstoss wird der Vorgang mehrmals wiederholt.

Diese eigentümliche Reizbewegung von *Paramecium* wird von BOZLER auf Grund der wohlbekannten Statozystentheorie von KOEHLER erklärt. Der auf den ersten Blick ausserordentlich kompliziert erscheinende Zilienmechanismus besteht nach ihm einfach darin, dass durch die Druckwirkung gewisser Einschlüsse des Entoplasmas Erregungen entstehen, die sich nur zu den jeweiligen erdnäheren Zilien fortpflanzen. Da das Tier hierbei ständig rotiert, wird die Schlagtätigkeit der Zilien dauernd in einem anderen Körperbezirk beschleunigt.

Bei Tieren, die unter dem Einfluss der Schwerkraft stehen, wirkt diese Erklärung zweifellos äusserst überzeugend, doch kann sie natürlich nicht auf jene Fälle angewandt werden, wo die Ebene der bogenförmigen Bewegungsbahn nicht vertikal ist. Solche Varianten dieser Bewegungsantwort sind jedoch

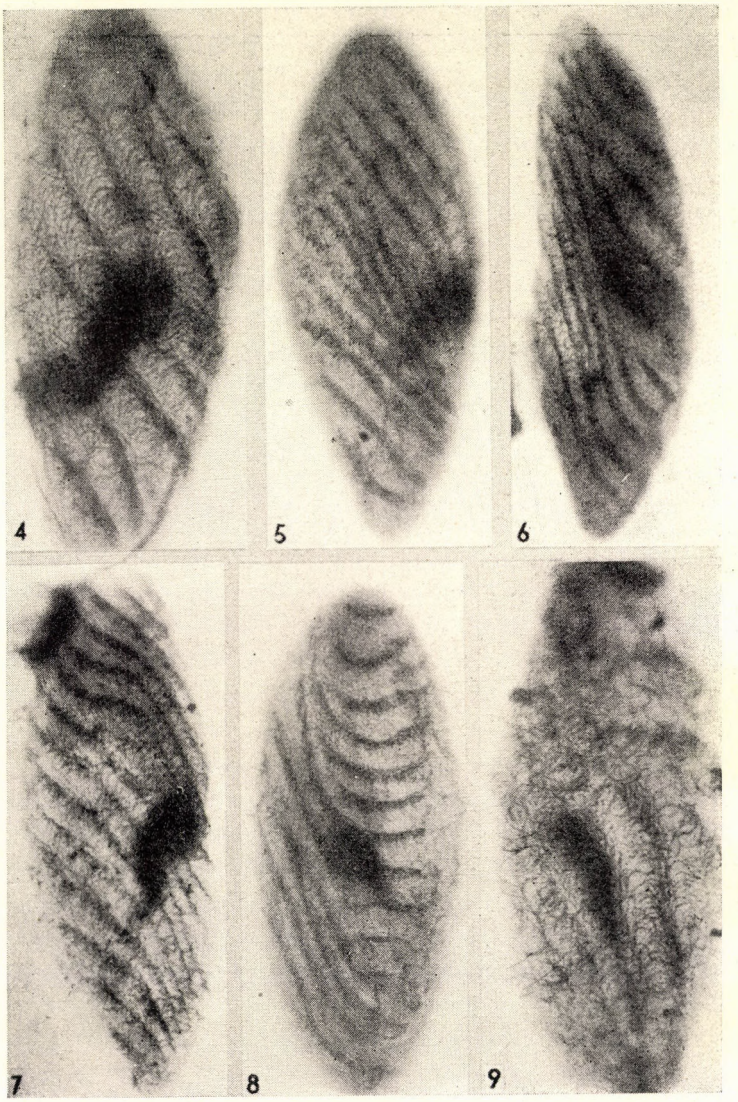


Abb. 4—9. Zilienwellenmuster von *Paramecium* während der normalen linksgewundenen Vorwärtsbewegung (Abb. 4) sowie die Wellenanordnung der einfachen Vermeidungsreaktionen bzw. des Bogenschwimmens unter Rotation (Abb. 5—9). Osmium-Hämatoxylin-Schnellfixierungsmethode. 300 ×

keineswegs selten. Oftmals wurde schon z. B. das charakteristische Bogenfahren von *Paramecium* entlang eines Tropfenrandes, also in der Ebene des Objektträgers beobachtet. In diesem Falle kann man anstatt an Erregungswellen, die im Inneren des Körpers, im Entoplasma entstehen, nur an den richtenden Einfluss von exogenen und vermutlich chemischen Reizen denken.

Der grundlegende Zilienmechanismus ist also offenbar dem in der vorhergehenden Bewegungskategorie beschriebenen gleich, mit dem Unterschied, dass sich auch hier — da das Tier eine verhältnismässig längere Zeit einer einseitigen unangenehmen Reizwirkung ausgesetzt ist — entsprechend dem Tempo der Rotation um die Körperachse die Schlagtätigkeit immer neuer Zilienbezirke rings um den Körper fortlaufend ändert bzw. sukzessive zur normalen Aktivität zurückkehrt. Der Bezirk der verändert arbeitenden Zilien wandert also — da die Lage der Reizquelle selbst unverändert bleibt — entgegengesetzt zur Rotationsrichtung an der Oberfläche des Tieres, ebenso wie bei den unter dem Einfluss der Schwerkraft stehenden Paramecien von BOZLER [2].

Es hat den Anschein, als ob in den obigen zwei Fällen die Orientierung im Reizfeld durch die unmittelbare Wirkung des reizenden Agens auf die Bewegungsorganellen selber zustande kommt. Es kann sich also hier um ebensolche direkte Funktionsreize handeln wie diejenigen, mit denen ALVERDES [3] die Einstellbewegungen des Tieres im Gleichstrom erklärt. Der Reiz, der einen bestimmten Bezirk der Körperfläche trifft, zwingt also die Zilien dieses Bezirkes auch in unserem Falle zu einer energischeren Schlagtätigkeit bzw. zur Änderung ihrer Schlagrichtung, so dass sich der Körper von der Reizquelle wegdreht. Wenn als Folge der Richtungsänderung des Körpers oder der Rotation um die Längsachse die Lokalwirkung des Reizes auf den betreffenden Bezirk aufhört, nehmen die Zilien sofort wieder ihre ursprüngliche Schlagweise auf.

Für sämtliche anderen Formen der Reizbewegungen ist charakteristisch, dass die Reaktion, obwohl sie sich letztlich an die gegebene Situation anpasst, d. h. zur Richtung der Reizquelle in Beziehung tritt, dennoch in ihrem Ablauf nicht durch Reizwirkungen bestimmt wird, die an den einzelnen Erfolgsorganellen direkt angreifen. Anstatt dessen antwortet der Einzeller als ganzes mit einer Reaktion, die auf einer koordinierten Tätigkeitsveränderung der Gesamtziliatur des Körpers beruht. Die fixierten Momentaufnahmen beweisen aber auch, dass die hierher gehörigen Reizbewegungen in einem wesentlichen Punkt im Gegensatz zu der JENNINGSschen Anschauung stehen: sie nehmen das Wimperkleid nicht nach einer einzigen starren, ein für allemal bestimmten Schablone in Anspruch.

Besonders interessant sind jene Fälle, wo der Reiz eine je nach der Körpergegend verschiedenartig beeinflusste und empfindlich ausbalancierte Funktionsänderung der Ziliatur zur Folge hat.

3. *Bogenschwimmen ohne Rotation.* Das gegen die Reizquelle zu schwimmende oder diese von der Seite berührende Tier dreht sich ohne Verminderung seiner Bewegungsgeschwindigkeit in einer scharfen Haarnadelkurve (häufig genau um 180 Grad) um, wobei inzwischen die Rotation um die Körperachse übergangsweise aufhört. Diese Reaktionsweise soll nach JENNINGS — wie wir sahen — auf einer Besonderheit in dem Schlage der Wimpern der linken Seite

beruhen, wobei der Schlageffekt der übrigen, unverändert nach rechts hinten arbeitenden Wimpern völlig kompensiert wird.

Ähnlicherweise beschreiben die Paramecien Kreisbahnen, wenn sie an irgendeinem Punkte ihrer Körperfläche mit kleinen, festen Körpern in Berührung kommen. Auch die in diesem Falle auftretende Bewegungsform wurde schon von JENNINGS beobachtet, wobei er ihr Zustandekommen mit der ausschliesslichen Strudeltätigkeit der Peristomalwimpern zu erklären vermeinte. Laut seiner Deutung beeinflusst der Kontaktreiz die Strudelung der Peristomalzilien nicht, dagegen hört die Tätigkeit der Körperzilien thigmotaktisch auf. Demgemäss ist die Verdrehungsrichtung, welchen Punkt des Körpers auch immer die Reizwirkung erreicht, lediglich morphologisch bedingt, und ist immer die Ventralseite gegen den Mittelpunkt der Bewegungsbahn gerichtet. Auf einen irrigen Punkt seiner Argumentation hatte übrigens schon früher auch LUDWIG hingewiesen [23], als er feststellte, dass bei alleiniger Strudelung der Peristomalzilien nur eine solche Variante der kreisenden Bewegung zustande kommen kann, bei der die Mundöffnung nicht gegen den Drehungsmittelpunkt, sondern eher nach aussen zu gerichtet ist.

Auf keine Weise lässt sich aber auch jene tägliche Erfahrung mit den Darlegungen von JENNINGS in Übereintstimmung bringen, dass unrotiertes Bogenschwimmen nach jeder beliebiger Körperseite hin erfolgen kann. Man hat also auch mit solchem Varianten dieser Reaktionsart zu rechnen, deren Entstehung nicht auf eine besondere Eigenschaft der Zilien zur Linken des Peristomfeldes oder auf die überwiegende Triebwirkung der Peristomalgegend, sondern auf eine entsprechende Funktionsänderung der gewöhnlichen Körperzilien zurückzuführen ist. Diese auf das Verhalten der lebenden Tiere basierte Folgerung wird in vollem Ausmass durch die fixierten Momentaufnahmen unterstützt (Abb. 10—12). In den Präparaten trifft man nämlich häufig auf Exemplare, an deren einen Seite sich in rein kaudale Richtung schlagende, also quergerichtete Wellenkämme ausgebildet haben. Diese konvergieren gewöhnlich während ihres Verlaufes gegen die entgegengesetzte Körperseite und verschwimmen allmählich. In anderen Fällen hört auf der antagonistischen Körperseite die metachronisch geregelte Zilienbewegung überhaupt auf. Die auf diese Weise beeinflusste Wimpertätigkeit kann, wenn man die Verteilung der auf den Protistenkörper wirkenden Triebkräfte berücksichtigt, nur ein Bogenschwimmen ohne Rotation zur Folge haben. Nach dem Zurückkehren sämtlicher Zilien in die ursprüngliche Schlagrichtung schaltet das *Paramecium* aufs neue auf die normale Vorwärtsbewegung um. Aus den Abbildungen geht auch deutlich hervor, dass das Ausbiegen fallweise gegen verschiedene Körperseiten zu erfolgen kann.

In einer weiteren Kategorie der Reizbewegungen differenziert sich die Bewimperung bezüglich ihrer Funktion in verschiedene scharf voneinander getrennte Bezirke. Den Anzeichen nach spielt die Erscheinung der Hemmung

bei der Auslösung der Reaktion eine bedeutende Rolle. Die physiologische Differenzierung des Zilienkleides ist in den einfachsten Fällen wahrscheinlich auf die verhältnismässig geringere Reizbarkeit der eingesenkten Peristomalgegend zurückzuführen.

4. *Dorsalwendung des Vorderendes.* Im Aktionssystem von *Paramecium* spielt auch nach JENNINGS jene Reizbewegung eine bedeutende Rolle, die er — wie aus dem Vorstehenden ersichtlich war — als eine extrem abgekürzte Form der vollen Fluchtreaktion qualifizierte (s. S. 298). Es sei hier betont,

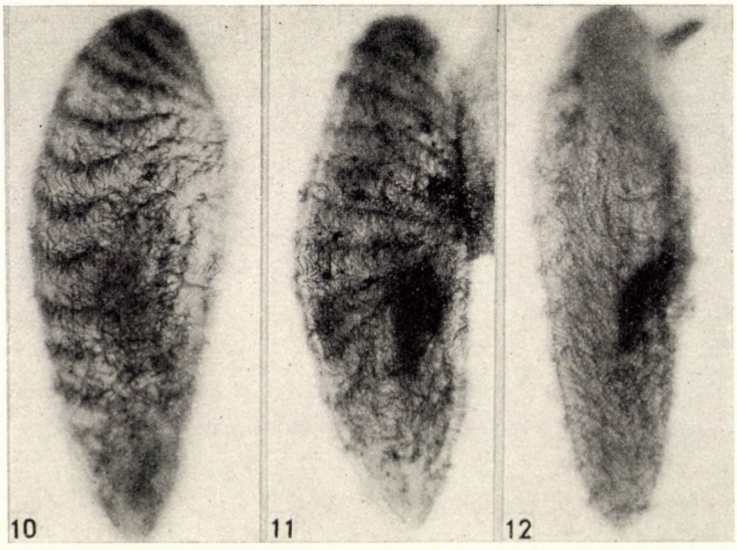


Abb. 10—12. Zilienwellen von Paramecien während des unrotierten Bogenfahrens. 300 ×

dass der Verfasser in keinem einzigen Falle in den Präparaten eine Zilienwellenanordnung beobachtet hat, die im Einklang mit JENNINGS' Vorstellung gestanden wäre. Demgegenüber gab es zahlreiche Individuen, aus deren fixiertem Zilienmuster auf einen weit einfacheren Mechanismus der aboralen Abschwenkung geschlossen werden muss. Aus diesen Fixationsbildern geht nämlich hervor, dass der Reiz nur die Tätigkeit der Körperzilien beeinflusst, ihre Schlagtätigkeit übergangsweise verlangsamt, völlig zum Stillstand bringt oder einen einmaligen synchronen Schlag sämtlicher Zilien nach vorne hervorruft. Gleichzeitig damit strudeln jedoch die Peristomalwimpern mit unveränderter Intensität weiter. Wie sich aus der Verteilung der Wirkkräfte folgern lässt, prallt das Tier zugleich mit der aboralen Wendung etwas zurück — was an den lebenden Individuen auch tatsächlich beobachtet werden kann — und führt mittlerweile entsprechend der Strudelrichtung der Peristomalzilien eine kurze Achsendrehung nach rechts aus (Abb. 13—15).

5. *Abwendung des Vorderendes nach einer beliebigen Körperseite.* Der grundlegende Wimpermechanismus dieser Variante weicht wesentlich von dem der vorigen ab und zeitigt eine Bewegungsantwort, die ebenfalls auf keine Weise in die JENNINGSsche Konzeption hineinpasst. An den fixierten Individuen bilden die überwiegende Mehrheit der Körperzilien sowie die Peristomalzilien keine metachronischen Wellen, dagegen fällt um das Vorderende, fallweise an einer jeweils anderen Seite, ein aus 2 bis 5 Wellenkämmen bestehendes, scharf umgrenztes Wellensystem in die Augen. Diese stark ausgeprägten, kurzen Wellen-

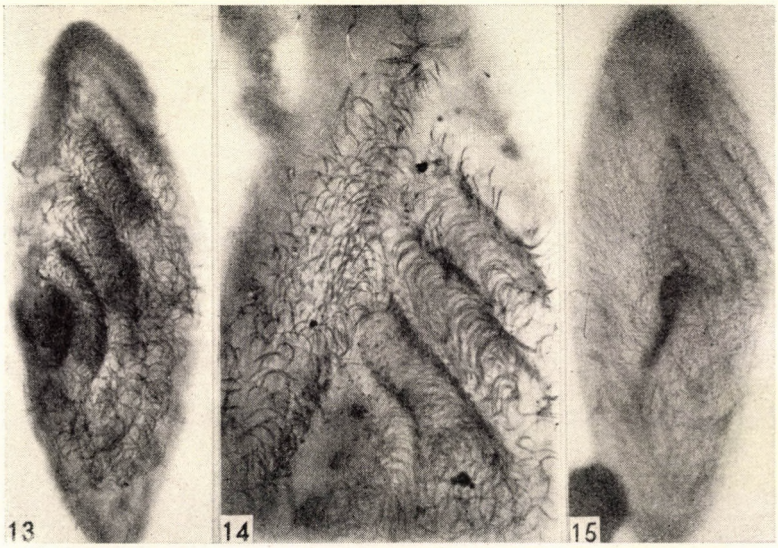


Abb. 13—15. Die Anordnung der metachronischen Zilienwellen während der Abwendung des vorderen Körperendes in aboraler Richtung. 300 × bzw. 600 ×

kämme sind nicht in Form von Schraubengewinden angeordnet, sondern reihen sich in Längs- oder Querrichtung oder in schräger Neigung aneinander. Ihre Strudelwirkung kann demnach in die verschiedensten Richtungen ausfallen (Abb. 16—21). Die Reizwirkung löst also in diesem Falle eine energische Schlagtätigkeit des unmittelbar getroffenen Zilienbezirkes aus, w ä h r e n d anderswo an der Körperfläche die Tätigkeit des Wimperkleides auch hier schwächer bzw. ungeordnet wird oder vollständig aufhört. Alle Anzeichen sprechen dafür, dass an den betreffenden Individuen die Zilienmechanik der zuerst von ALVERDES beobachteten Abwendungen nach einer beliebigen Körperseite festgehalten wurde (s. S. 298).

6. *Zurückprallen.* Die erste Phase der vollen Fluchtreaktion, das Zurückfahren, beruht laut Ergebnis von früheren Untersuchungen [28] auf einer metachronisch geregelten Schlagtätigkeit des Wimperkleides. Die Fortpflanzungsgeschwindigkeit der metachronischen Wellen liegt aber in einer verhältnis-

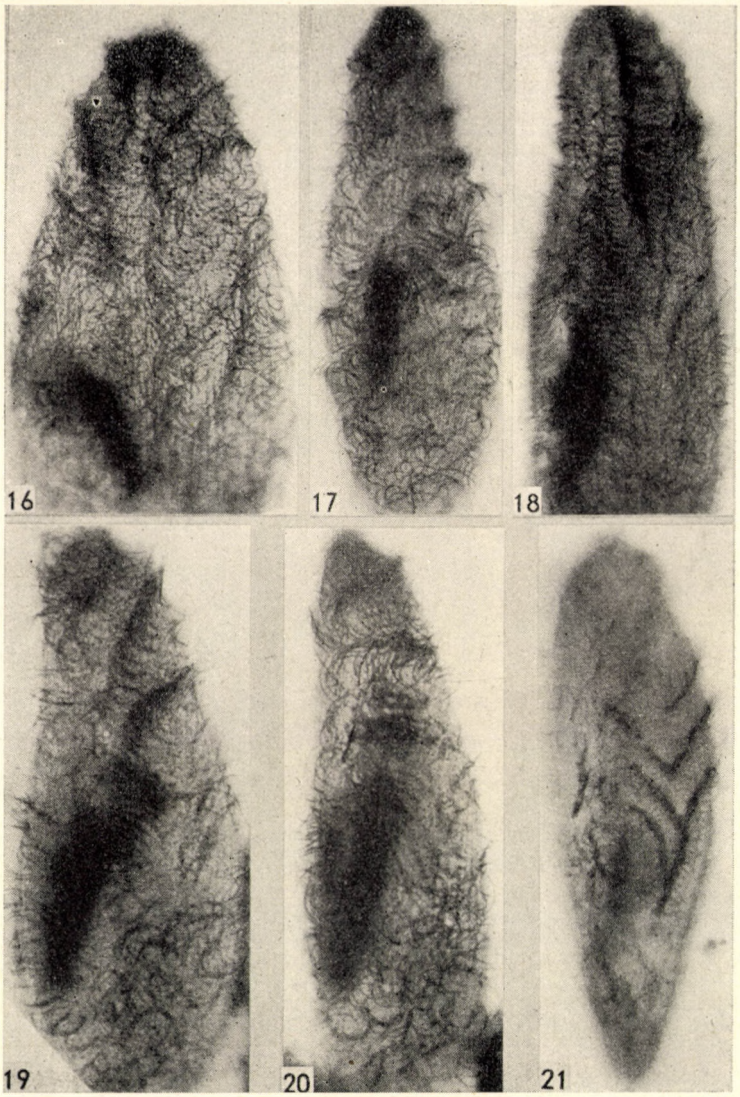


Abb. 16—21. Lokal modifizierte Wellenkämme der sich mit ihrem Vorderende nach verschiedenen Körperseiten ausbiegenden Paramecien. 300 ×

mässig niederen Grössenordnung, so dass man jenes blitzschnelle Zurückprallen auf kürzeren Streckenabschnitten, durch das die gleichmässige Normalbewegung des Infusors oft unterbrochen wird, wohl kaum mit Hilfe einer metachronisch koordinierten Wimperarbeit erklären kann. In den Abb. 22 und 24 ist wahrscheinlich der grundlegende Zilienmechanismus dieser Reizbewegungen festgehalten. An diesen Exemplaren bilden die Körperzilien keine Bewegungswellen, sondern statt dessen liegen sämtliche Zilien in gestreckter Haltung nach

vorne gerichtet. Es scheint, dass als Folge eines energisch wirkenden Reizes (siehe an den Mikrophotographien die Bündel der ausgeschleuderten Trichozysten um den Angriffspunkt des Reizes!) die sich am Körper blitzschnell ausbreitende Erregungswelle jede einzelne Zilie des Körpers zu einem fast gleichzeitigen, apikal gerichteten Schlag zwingt. Bis zum neuerlichen Auftreten der die normale Zilientätigkeit regelnden Erregungswellen hört die Zilienbewegung in diesem Endstadium des Schlages übergangsweise auf. Eine solche

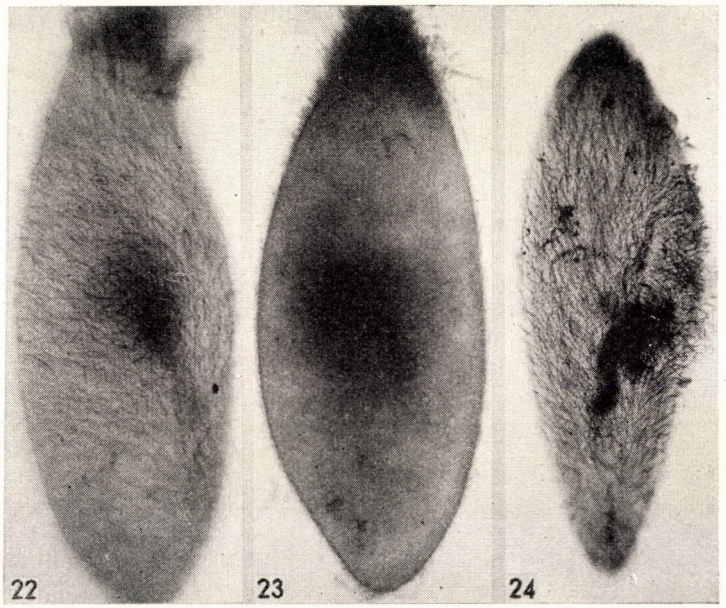


Abb. 22—24. Nicht in metachronischen Wellen angeordnete Ziliatur von Paramecien während des Zurückprallens. Abb. 23 zeigt dasselbe Tier wie Abb. 22, aber in Tiefeneinstellung. Die Angriffsrichtung des Reizes am vorderen Körperende wird durch die ausgeschleuderten Trichozysten angezeigt. 300 ×

synchron geregelte Tätigkeitsveränderung der Ziliatur ist zweifellos geeignet, das Tier von der unangenehmen Reizzone auf eine kleinere Entfernung zurückzuwerfen. Dies wird durch Abb. 23 bezeugt, die das in Abb. 22 aufgenommene Tier in Tiefeneinstellung wiedergibt, dessen Schwanzzilien sich als Folge einer rückläufigen Körperbewegung passiv in die apikale Richtung umbiegen.

Die Anwendung der Schnellfixierungstechnik auf Paramecien, die vor der Erstarrung Reizwirkungen verschiedener Art ausgesetzt wurden, brachte also Ergebnisse, die insbesondere von zwei Gesichtspunkten aus der Beachtung wert erscheinen.

Die unmittelbar vor der Fixierung an den lebenden Tieren beobachteten Reizbewegungen entsprechen zweifelsohne den JENNINGSschen sog. »abgekürzten Suchbewegungen«, die bisher als Teile der Fluchtreaktion bzw. deren

Kegelschwingungsphase gedeutet wurden. An den erstarrten Individuen sucht man aber vergebens den angenommenen Zilienmechanismus dieser Phase — also die funktionelle Differenzierung der rechts und links vom Mundfeld gelegenen Körperziliatur. An Stelle der sich nach einem einzigen starren Schema abspielenden Fluchtreaktion bzw. ihrer abgekürzten Modifikationen erhält man — im Gegensatz zur zweiten Forderung der Versuchs- und Irrtumslehre — die fixierten Momentaufnahmen einer Anzahl von wohlcharakterisierten, zweifellos selbständigen Reizbewegungen.

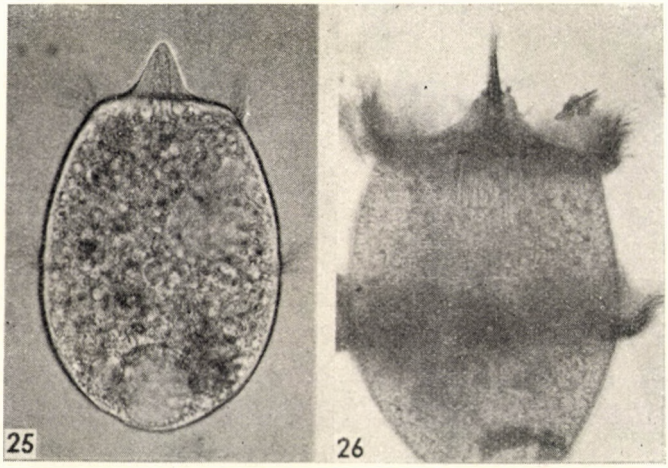


Abb. 25—26. Zwei Exemplare von *Didinium nasutum* im lebenden Zustand bzw. nach Behandlung mit dem Schnellfixierungsverfahren, festgehalten im Augenblick des Ausschleuderns der Schlundtrichozysten. 350 ×

Gleichzeitig weist aber an den meisten Individuen die eigentümliche Anordnung der metachronischen Zilienwellen auch darauf hin, dass eine lokale Funktionsänderung der verschiedensten Zilienbezirke bei der Hervorrufung der betreffenden Bewegungsänderungen eine Rolle spielt. Die heutige Auffassung rechnet, wie zu sehen war, lediglich im Falle von elektrischem Strom und der Schwerkraft mit einer lokalen Beeinflussung der Zilientätigkeit, so dass der obige unerwartete Befund nicht nur den ersten Satz der Probierungstheorie, sondern gleichzeitig auch das grundlegende Problem der Reizbarkeit der Einzeller berührt. Nach den Bildern zu urteilen unterliegt es keinem Zweifel, dass die Richtungsänderung des Körpers nicht nach einer morphologisch bestimmten Seite erfolgt. Nun lässt es sich allerdings auf Grund der fixierten Tiere natürlich nicht entscheiden, ob die festgehaltene Reaktion auf bestimmt gerichteten oder von der Lage der Reizquelle unabhängigen Tätigkeitsveränderungen der Zilien beruht. Ebendeswegen wurde angestrebt, den vermutlichen kausalen

Zusammenhang zwischen der Reizwirkung und der lokalen Funktionsänderung des Zilienkleides nach Möglichkeit auch experimentell zu bestätigen.

Hinsichtlich der anzuwendenden Methodik bestand anfänglich die Absicht, die Paramecien künstlichen und lokal applizierten mechanischen oder chemischen Reizwirkungen auszusetzen und die Veränderungen im normalen Mechanismus der Ziliatur mit Hilfe des Schnellfixierungsverfahrens für die Analyse zugänglich zu machen. Wegen verschiedener technischer Schwierigkeiten und besonders weil es nicht gelang, die lokale Reizung an einer zur Her-

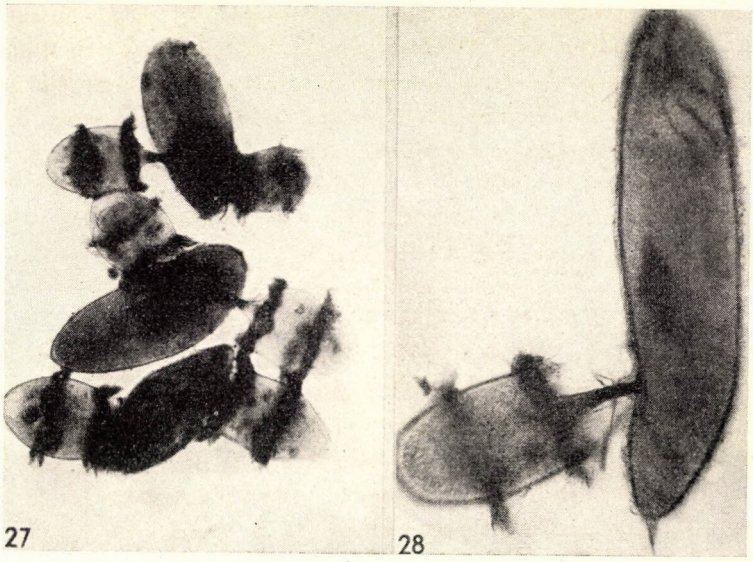


Abb. 27—28. Von ausgehungerten Didinien angegriffene Paramecien. 120 × bzw. 240 ×

stellung der Präparate notwendigen genügenden Anzahl von freischwimmenden Tieren gleichzeitig zu verwirklichen, führten diese Versuche nicht zum gewünschten Ergebnis.

Danach tauchte der Gedanke auf, den Versuch mit der Natur selbst, genauer gesagt mit einem der gefährlichsten Feinde von *Paramecium*, mit *Didinium* (Abb. 25), auszuführen. Laut früherer Untersuchungen [27] wird nämlich das erbeutete *Paramecium* — im Gegensatz zu der in der Literatur verbreiteten Auffassung — nicht gelähmt, sondern führt bis zur Endphase des Einverleibungsprozesses äusserst lebhafte Abwehrbewegungen aus. So schien denn das ungefähr 4—6 μ Durchmesser aufweisende Bündel der aus dem Rüssel des Räubers ausgeschleuderten Schlundtrichozysten (Abb. 26), das das Opfer ergreift, das geeignetste und feinste Mittel zu sein, an den verschiedensten Punktes des seine natürliche Bewegung ausführenden *Paramecium* leichte,

aber scharf umgrenzte Reizeffekte auszulösen. Mit einen bereits grösseren Bezirk erfassenden und dabei weit drastischeren Reizwirkungen ist in den späteren Einverleibungsstadien zu rechnen, wenn also die weit aufgerissene Mundöffnung von *Didinium* eng an der Körperfläche von *Paramecium* aufliegt bzw. wenn die Beute allmählich im Inneren des Räubers verschwindet.

Schon die unvoreingenommene Lebendbeobachtung lässt erkennen, dass das Verhalten des gefangenen Tieres gar nicht aus zahlreichen, vom Angriffspunkt unabhängigen und sich nach demselben starren Schema abspielenden Fluchtreaktionen zusammensetzt —, wie dies die JENNINGSsche Theorie verlangen würde. Anstatt dessen schnellt das *Paramecium* je nachdem, welcher Punkt seines Körpers von dem Trichozystenbündel bzw. mit der Mundöffnung des Raubinfusors angepackt wird, einfach vorwärts, schwimmt zurück, dreht sich um seine Längsachse, weicht nach verschiedenen Körperseiten aus, bewegt sich entlang eines Kreises usw., bzw. wandelt diese Bewegungsformen in der mannigfaltigsten Weise ab. Das Tier ist also scheinbar »bestrebt« — wie in einer chemischen Reizzone —, mit Hilfe der verschiedensten Bewegungsantworten direkt der unangenehmen Reizwirkung zu entfliehen. Obwohl der Angriffspunkt des Reizes in diesem Falle bereits bekannt ist, so ist es dennoch vorläufig nicht möglich, aus den ausgelösten Bewegungsreaktionen auf ihren feineren Mechanismus zu folgern. Wenn nämlich die blitzschnellen Zickzackbewegungen und das Herumwälzen des mit dem Räuber eng verbundenen Opfers auch noch eine Zeitlang verfolgt werden können, so wird man dennoch niemals die Gewissheit erlangen, in welchem Ausmass die inzwischen beobachteten Bewegungsänderungen von der gleichzeitigen Eigenbewegung von *Didinium* beeinflusst sind. Diese letztere Schwierigkeit wurde durch eine entsprechend modifizierte Anwendung der Schnellfixierungsmethodik überwunden.

Durch Hinzugabe einer grossen Zahl von ausgehungerten Didinien zu einem die Versuchstiere reichlich enthaltenden Wassertropfen und nach empirischer Feststellung des zum Fixieren geeignetsten Zeitpunktes gelang es schliesslich die vom Trichozystenbündel ergriffenen bzw. in den verschiedenen Phasen der Einverleibung getöteten Paramecien in grosser Zahl zu erhalten (Abb. 27—28). Die Analyse der in ihrem natürlichen Bewegungszustand festgehaltenen Ziliatur dieser Individuen zeitigte in mehrfacher Beziehung, so auch hinsichtlich der Fortpflanzungsart der lokal entstandenen Erregung, interessante Ergebnisse. Diese Bilder bestätigen z. B. in überzeugender Weise, dass sich die die Tätigkeitsänderung der Zilien auslösenden Erregungsimpulse nicht entlang der interziliären Fasern (Neuronemen) ausbreiten können [30, p. 193]. In bezug auf unser Problem sei hier nur darauf hingewiesen, dass sich das normale Wellenmuster des Zilienkleides (Abb. 4), als Zustand des Erregungsgleichgewichts, je nach dem Angriffspunkt in der verschiedensten Weise ändert.

Von den zahlreichen mikrophotographischen Aufnahmen sollen hier nur einige vorgeführt werden. In Abb. 29 und 30 hat *Didinium* die Schlundgegend

bzw. das hintere Körperende von *Paramecium* angegriffen. In Vergleich zu der Zilienwellenanordnung der während ihrer ungestörten Vorwärtsbewegung fixierten Individuen haben sich an diesen nur die Wellenabstände, d. h. die Zeitdauer der normalen Bewegungsperiode der einzelnen Zilien auf der gesamten

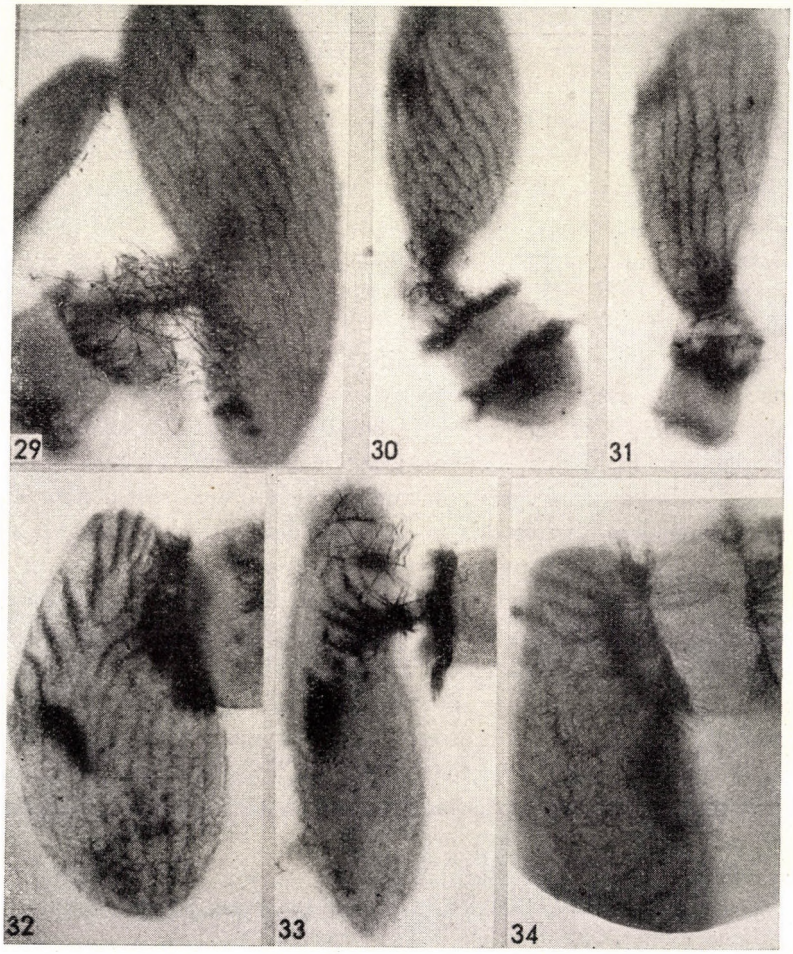


Abb. 29—34. Die Veränderung des normalen Zilienwellensystems im Falle von die verschiedensten Körperteile von *Paramecium* angreifenden Didinien. 240 ×

Körperoberfläche gleichmässig verkürzt. Das *Paramecium* »versuchte« also einfach, durch die Steigerung seiner Geschwindigkeit zu entfliehen. In den nächsten Bildern haftet das Trichozystenbündel am vorderen Körperende (Abb. 31) bzw. an einem jeweils anderen Punkt der vorderen Körperhälfte (Abb. 32—34), der äquatorialen Zone (Abb. 35—36) und der hinteren Körperhälfte (Abb.

37—38). Das normale Wellensystem des Wimperkleides hat sich dementsprechend in verschiedenen Varianten derweise verändert, dass die Strudeltätigkeit der Ziliatur eine rückläufige Bewegung, Abschwenkungen des Vorderendes nach verschiedenen Richtungen bzw. Bewegungen des Körpers entlang einem Kreise um den Angriffspunkt hervorruft.

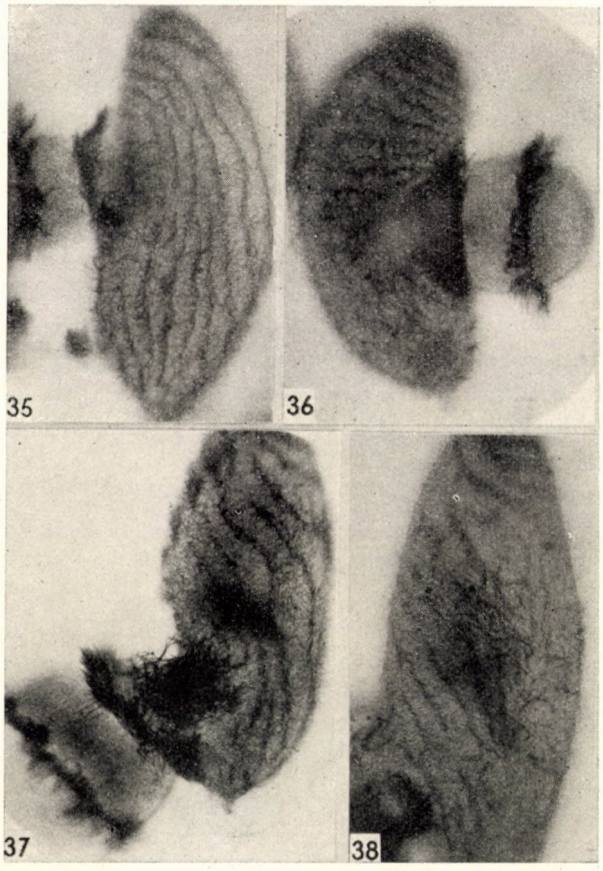


Abb. 35—38. Weitere Fälle der lokalen Reizwirkung auf die Zilientätigkeit von *Paramecium*. 240 ×

Die fixierten Momentaufnahmen bezeugen also — in vollem Einklang mit den an den lebenden Individuen gemachten Erfahrungen —, dass auch infolge einer einseitigen chemischen, thermischen und mechanischen Reizung eine Differenz zwischen dem lokomotorischen Effekt der reiznahen und reizfernen Zilien entstehen kann, was nur auf Grund einer Unterschiedsempfindlichkeit der verschiedenen Flanken erklärbar ist. Soweit die bisherigen, noch reichlich lückenhaften Erfahrungen einen Schluss zulassen, besteht die Reaktion im allgemeinen in der Beschleunigung oder Hemmung der metachronischen

Zilienarbeit, in der Auslösung eines plötzlichen synchronen Schlages des Zilienkleides, am häufigsten aber in einer vorübergehenden Verschiebung der normalen Schlagrichtung der lokomotorischen Elemente. Diese Funktionsänderungen der Ziliatur können dabei auf den unmittelbar gereizten Zilienbezirk beschränkt bleiben oder aber auf die gesamte Körperfläche übergreifen. Eine besondere Beachtung verdient der Umstand, dass die Beeinflussung der Zilienbewegung auch in diesem letzten Falle für die einzelnen Glieder des lokomotorischen Apparates nicht unbedingt gleichmässig und gleichsinnig ist. Der in der Bewegungsänderung des Körpers zutage tretende Enderfolg der Reizung wird oft durch die Zusammenarbeit der Ziliatur der antagonistischen Körperseiten bedingt, indem gleichzeitig mit der Beschleunigung der Rudertätigkeit der reiznahen Seite sich der Schlageffekt der reizfernen Bewegungsorganellen abschwächt bzw. vollständig aufhört. Die oft voneinander abweichende Wellenanordnung verschiedener, aber in derselben Körpergegend angegriffener Individuen lässt übrigens ebenfalls den Schluss zu, dass die Reaktion keine so einfache qualitative und quantitative Abhängigkeit aufweist, wie sie die Tropismenlehre erfordern würde. Diese Bilder demonstrieren vorzüglich, dass der jeweilige Charakter der Reizantwort durch verschiedene Faktoren, in erster Linie offensichtlich durch den augenblicklichen inneren physiologischen Zustand des Tieres, mitbestimmt werden kann.

Besprechung der Ergebnisse

Die Prinzipien der Versuchs- und Irrtumstheorie, die eine primitive Erscheinungsform der Reizbarkeit bzw. die zwischen enge Grenzen gezwängte Reaktionsfähigkeit der Einzeller verkündet, lassen sich zweifellos sehr gut mit der früher noch fast allgemein vertretenen Anschauung vereinen, wonach die einzellige Stufe der Organisation sowohl strukturell als auch physiologisch einen ausserordentlich einfachen Entwicklungszustand des Lebens darstellt. Wahrscheinlich haben also diejenigen Forscher recht, die die Ursache für die günstige Aufnahme dieser Theorie vor allem in diesem Umstande begründet sahen [2]. Immerhin wies diese in ihrem logischen Aufbau übrigens gut durchdachte Theorie von allem Anfang an schwache Punkte auf. So stellte von einer umfangreichen Gruppe der Einzeller, von den Rhizopoden, bei denen zur Auslösung gerichteter Bewegungen die lokale Einwirkung des Reizes auf eine bestimmte Körperstelle notwendig ist, JENNINGS selber fest, dass ihr Verhalten eher mit den Grundforderungen der Tropismenlehre übereinstimmt. Mit der Begründung, dass bei Organismen ohne beständige Körperform die Anwendung der Bezeichnung »Orientierung« noch wenig Sinn habe, schenkte er jedoch dem merkwürdigen Verhalten dieser Tiere keine besondere Aufmerksamkeit.

Die Versuchs- und Irrtumstheorie vermochte aber in ihrer ursprünglichen Form selbst bei den einzelligen Organismen mit feststehenden Körperachsen nicht mit dem Anspruch aufzutreten, eine allgemeingültige Erklärung für die Orientierung in einem Reizfeld geben zu können. Einige Reizbewegungen (Rheotaxis, Geotaxis) liessen sich von allem Anfang an nur mit Müh und Not, und die Galvanotaxis, als eine relativ zur Reizquelle dauernd gerichtete Bewegungsreaktion, überhaupt nicht mit den Grundpostulaten der Theorie in Einklang bringen. Nun hängt aber nach der Auffassung von JENNINGS die Art der Reaktion nicht vom Reizanlass, sondern nur von der Organisation des betreffenden Infusors ab, so dass nach ihm zweierlei Reizbewegungsformen bei ein und demselben Organismus nicht wahrscheinlich sind. Er ging daher nur folgerichtig vor, als er einerseits nachdrücklich den ausgesprochenen Laboratoriumsartefaktencharakter der nicht in seine Konzeption hineinpassenden Galvanotaxis betonte und andererseits versuchte, auch die übrigen, »scheinbar« topotaktischen Reizbewegungen auf eine Anzahl aufeinanderfolgender phobischer Reaktionen zurückzuführen.

Den ersten empfindlichen Schlag erhielt indessen diese Lehre erst durch jene Forschungen, als deren Ergebnis ein tieferer Einblick in die grundlegenden physiologischen Prozesse der positiven Rheotaxis sowie der negativen Geotaxis gewonnen werden konnte. Es stellte sich nämlich heraus, dass auch diese beiden Reizbewegungen *nicht* als Folge einer längeren oder kürzeren Reihe von Probierbewegungen zustande kommen, sondern dass sie gleichfalls in die Kategorie der wahren Einstellungsreaktionen gehören. Besonders infolge der Berücksichtigung dieser Tatsachen bildete sich dann die Auffassung heraus, laut welcher die der Orientierung unmittelbar und mittelbar dienenden Reaktionsarten, also die topischen und phobischen Reaktionen, gleichberechtigt nebeneinander stehen sollen [20]. Wenn es dagegen zutrifft, dass die Empfindlichkeit ein und desselben Tieres gegenüber derselben Reizart in dem Sinne wechselt, dass es einmal die den Körper treffenden verschiedenen Reizintensitäten räumlich nebeneinander, ein andermal jedoch nur zeitlich nacheinander zu perzipieren imstande ist, dann ist es tatsächlich ein hoffnungsloses Unterfangen, ihr Verhalten in einem Reizfeld ausschliesslich auf Grund des einen oder des anderen Orientierungsprinzips deuten zu wollen [19].

Die unerlässliche Vorbedingung für eine solche Vereinigung der auseinanderstrebenden Ansichten besteht allerdings darin, dass diese beiden prinzipiell verschiedenen Methoden der Raumorientierung, die völlig den klaren Ausgangsdefinitionen entsprechen, auf der einzelligen Stufe der Organisation auch tatsächlich existieren. In dieser Beziehung ist nun jene allmähliche Verschiebung hervorzuheben, die seit JENNINGS in der Bewertung der bei der Orientierung in Betracht kommenden zwei Reaktionsmöglichkeiten zu Gunsten der Einstellungsreaktion eingetreten ist. Und hier mahnt uns besonders der Umstand zum Nachdenken, dass sich in der letzten Zeit in den verschiedensten syste-

matischen Gruppen der Einzeller die überwiegende Mehrheit gerade der am gründlichsten untersuchten Reizbewegungen [5, 24, 25] ebenfalls als mehr oder weniger gerichtete Formen der Bewegungsantworten oder zumindest als »Übergangsfälle« gegen das topische Verhalten zu erwiesen haben.

Die Reaktionsweise von *Paramecium* gegenüber den mechanischen, chemischen und thermischen Reizen seiner natürlichen Umgebung wird jedoch von der Fachliteratur bis zum heutigen Tage unverändert als das Schulbeispiel für das phobische Verhalten aufgefasst. Es sei aber auch hier daran erinnert, dass sich unser Tier diese besondere Stellung im Reiche der Organismen keineswegs durch die ausschliessliche Anwendung der typischen Fluchtreaktion bei Anwesenheit der betreffenden Reizarten verdient hat. Bei einer solchen Beurteilung seines Verhaltens kamen vielmehr jene »abgekürzten Suchbewegungen« in Betracht, die seit JENNINGS als Teilhandlungen einer vollen Fluchtreaktion und auf dieser Grundlage gleichfalls als ungerichtete Reizbewegungen angesehen werden.

In den im vorstehenden geschilderten Untersuchungen wurde nun die nähere Analyse gerade dieser, also der im täglichen Leben des Tieres vorherrschenden kurzen Reaktionen versucht. Das Endergebnis dieser Untersuchungen lässt sich wie folgt zusammenfassen:

1. Jede dieser »Suchbewegungen« beruht offenkundig auf einem selbständigen Zilienmechanismus. 2. Sie haben nichts mit der Fluchtreaktion gemein. 3. Obwohl sie nicht *dauernd* gerichtet sind, wechselt ihr Ablauf dennoch gewöhnlich je nach dem Angriffspunkt des Reizes.

Es liegt auf der Hand, dass sich mit diesen Feststellungen auch das vor 50 Jahren von JENNINGS über die Bewegungsreaktionen von *Paramecium* selbst gezeichnete Bild grundlegend verändert. Bei Berücksichtigung sämtlicher Reizarten steht ja auch hier nur mehr eine einzige, in der Lebensführung des Tieres untergeordnete Probierbewegung, nämlich die volle Fluchtreaktion, einer geradezu unabsehbaren Mannigfaltigkeit von kürzere oder längere Zeit gerichteten Reizbewegungen gegenüber!

Weitere Untersuchungen werden berufen sein, Licht in die Frage zu bringen, ob zumindest dieser, früher als universal betrachtete, negative Bewegungskomplex in jeder Beziehung den Kriterien der phobischen Reaktionen bzw. der Versuchs- und Irrtumstheorie entspricht.

LITERATUR

1. ALVERDES, FR. (1922) Studien an Infusorien über Flimmerbewegung, Lokomotion und Reizbeantwortung. *Schaxels Arb. Geb. exper. Biol.*, **3**, 1—123.

2. ALVERDES, FR. (1922) Zur Lehre von den Reaktionen der Organismen auf äussere Reize. *Biol. Zbl.*, **42**, 218—222.

3. ALVERDES, FR. (1923) Über Galvanotaxis und Flimmerbewegung. *Biol. Zbl.*, **43**, 50—70.

4. BOZLER, E. (1926) Reizphysiologische Untersuchungen an *Paramecium*. *Zool. Anz. Suppl.*, **2**, 124—129.
5. BUDER, J. (1917) Zur Kenntnis der phototaktischen Richtungsbewegungen. *Jahrb. wiss. Bot.*, **58**, 105—128.
6. DEMBOWSKI, J. (1923) Über die Bewegungen von *P. caudatum*. *Arch. Protistenkde.*, **47**, 25—54.
7. ENGELMANN, TH. W. (1882) Über Licht- und Farbenperception niederster Organismen. *Pflügers Arch.*, **29**, 387—398.
8. HARTMANN, M. (1953) Allgemeine Biologie. 4. Aufl. Fischer, Stuttgart.
9. HEMPELMANN, F. (1926) Tierpsychologie vom Standpunkte der Biologen. Akademische Verlagsges., Leipzig.
10. JENNINGS, H. S. (1899) Reactions to localized stimuli in *Spirostomum* and *Stentor*. *Amer. Nat.*, **33**, 373—389.
11. JENNINGS, H. S. (1899) Laws of chemotaxis in *Paramecium*. *Amer. J. Physiol.* **2**, 355—379.
12. JENNINGS, H. S. (1899) The mechanism of the motor reactions of *Paramecium*. *Amer. J. Physiol.*, **2**, 311—341.
13. JENNINGS, H. S. (1899) The psychology of a Protozoan. *Amer. J. Psychol.*, **10**, 503—515.
14. JENNINGS, H. S. (1900) On the movements and motor reflexes of the Flagellata and Ciliata. *Amer. J. Physiol.*, **3**, 229—260.
15. JENNINGS, H. S. (1901) On the significance of the spiral swimming of organism. *Amer. Nat.*, **35**, 369—378.
16. JENNINGS, H. S. (1904) Reactions to heat and cold in the Ciliate Infusoria. *Carnegie Inst. Washington*, **16**, 5—28.
17. JENNINGS, H. S. (1904) The behaviour of *Paramecium*. *J. Comp. Neurol. Psychol.*, **14**, 441—510.
18. JENNINGS, H. S. (1914) Die niederen Organismen, ihre Reizphysiologie und Psychologie. Übers. von E. Mangold. Teubner, Leipzig—Berlin.
19. KOEHLER, O. (1931) Die Orientierung von Pflanze und Tier im Raume. *Biol. Zbl.*, **51**, 36—58.
20. KÜHN, A. (1919) Die Orientierung der Tiere im Raum. Fischer, Jena.
21. LOEB, J. (1906) Vorlesungen über die Dynamik der Lebenserscheinungen. Leipzig.
22. LOEB, J. (1913) Die Tropismen. In: WINTERSTEIN, Hdb. vergl. Physiol., **4**, 213—350.
23. LUDWIG, W. (1929) Untersuchungen über die Schraubenbahnen niederer Organismen. *Z. vergl. Physiol.*, **9**, 84—112.
24. METZNER, P. (1923) Studien über die Bewegungsphysiologie niederer Organismen. *Naturwiss.*, **11**, 365—372, 395—399.
25. METZNER, P. (1949) Zur Kenntnis der Morphologie und Bewegung von *Thiovolum Mülleri* (WARMING) LAUTERBORN. *Biol. Zbl.*, **68**, 49—58.
26. PÁRDUCZ, B. (1952) Új gyorsrögzítő eljárás a véglénykutatás és oktatás szolgálatában. Eine neue Schnellfixierungsmethode im Dienste der Protistenforschung und des Unterrichtes. *Ann. Nat. Mus. Nat. Hung.*, **2**, 5—12 (Ungarisch, deutsche Zusammenfassung.)
27. PÁRDUCZ, B. (1954) Táplálkozásbiológiai és cytológiai vizsgálatok Didiniumokon. Ernährungsbiologische und zytologische Untersuchungen an Didinien. *Biol. Közl.*, **1**, 57—68. (Ungarisch, deutsche Zusammenfassung.)
28. PÁRDUCZ, B. (1954) Reizphysiologische Untersuchungen an Ziliaten. I. Über das Aktionssystem von *Paramecium*. *Acta Microbiol. Hung.* **1**, 176—221.
29. PÁRDUCZ, B. (1954) Reizphysiologische Untersuchungen an Ziliaten. II. Neuere Beiträge zum Bewegungs- und Koordinationsmechanismus der Ziliatur. *Acta Biol. Hung.*, **5**, 169—212.
30. PÁRDUCZ, B. (1955) Reizphysiologische Untersuchungen an Ziliaten. III. Über die Tätigkeit der Peristomalzilien von *Paramecium*. *Ann. Nat. Mus. Nat. Hung.*, **6**, 189—195.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИОЛОГИИ ВОЗБУЖДЕНИЯ РЕСНИЧАТЫХ ИНФУЗОРИЙ

IV. Возбудимость туфельки *(Paramecium)*

Автором была проверена теория *Дженнингса* об ориентировке в пространстве, общепринятая в области химических, механических и тепловых раздражений, над классическим объектом исследований физиологии возбуждения, *Paramecium*, применяя осмиевый-гематоксилиновый метод быстрой фиксации, и параллельно с этим экспериментальные исследования при жизни.

В противоположность положениям теории *Дженнингса* автор установил следующее :

Движения возбуждения, рассматриваемые сокращенными видоизменениями реакции отклонения, на самом деле являются движениями, основанными на самостоятельном механизме ресниц и не имеют ничего общего с реакцией отклонения *Дженнингса*.

Наряду с вышеупомянутыми движениями возбуждения, туфельки реагируют еще многими другими ответными реакциями на раздражения. Следовательно, реакция отклонения не является единственным и даже не самым частым способом ориентации в поле раздражения.

Двигательные реакции определенно придерживаются пространственного расположения источника раздражения, но они не являются длительно ориентированными.

Вызыванию двигательных реакций способствует возбудимость *Paramecium*, которая гораздо больше, чем это предполагалось до сих пор, причем на действие местных раздражений деятельность ресниц также может весьма разнообразно локально изменяться по различным областям поверхности тела.

STUDIES ON THE REACTIONS TO STIMULI IN THE CILIATE INFUSORIA

IV. On the power of response to stimuli of *Paramecium*

By parallel application of the osmium-haematoxyline quick-fixation technique and by experimental studies on living Paramecia there were reexamined some principles of JENNINGS' theory of the orientation in relation to stimuli, a theory generally acknowledged in unicellular organisms concerning the different chemical, mechanical and thermal stimuli.

In contrast to the basic postulates of the theory of trial and error the following were ascertained :

The responses to stimuli considered as the shortened variants of the avoiding reactions, are in fact changes of movement based upon independent ciliary mechanisms, which have nothing in common with the so-called "motorreflex" of JENNINGS.

Besides the above-mentioned responses to stimuli, *Paramecium* disposes also of other movement reflexes for responding to stimuli, hence the avoiding reaction does not represent the only possible, yet not even the most frequently applied method of orientation in relation to stimuli.

These short orientated reactions show in their course a certain relation to the localisation of the stimulus, they are, however, not durably orientated.

From the great variety of movement responses it might be inferred that the degree of development of the irritability of *Paramecium* is considerably higher than was assumed hitherto ; i. e. in consequence of the local effects of the stimuli, ciliary activity may also vary locally, even simultaneously in the most diversified manner in the most different areas of the body surface.

Thus in the action system of *Paramecium*, according to the above postulates, only JENNINGS' typical avoiding reaction combined of three phases may be regarded as actual trial movement, hence the revision of the statements concerning the course and the physiological basis, resting largely on the subjective observation of the Protozoon body in its entirety, appears to be a particularly timely task.

BÉLA PÁRDUCZ, Budapest, VIII., Baross u. 13., Ungarn.

OCCURRENCE OF ANTIBACTERIAL COMPOUNDS IN SEEDS AND FRUITS

L. FERENCZY

INSTITUTE OF PLANT PHYSIOLOGY OF THE UNIVERSITY, SZEGED (HEAD : I. SZALAY)

(Received May 18, 1955)

Summary

Examining the effect of the intact seeds with the agar diffusion method and in some cases that of the fruit of 512 species, respectively varieties from 88 plant families on terricoline bacteria it could be ascertained that the seeds or fruits of 52 species and varieties from 19 families contain antibacterial compounds. Their activity is directed primarily against the Gram-positive organisms. No close connection is found in the distribution of active substances per families. Within certain plant species — probably according to age and environmental factors — the inhibitor content varies according to the individual, whereas in others it is nearly stable. In the cases observed by us the antibacterial compounds — with the exception of the species *Fraxinus* — were localised in the seed-coat and the external layer of the fruits.

Introduction

Antibacterial and antifungal compounds have been demonstrated hitherto from the vegetative parts of numerous plants [1, 4, 6—12, 14, 15, 17—19, 21—25]. The literature reports on several cases when active principles have been found also in seeds and fruits. OSBORN [21] describes the seed extract of several *Crucifera* and *Anemona recta* to possess antibacterial properties. IVÁNOVICS and HORVÁTH [11, 13] extracted the highly active raphanin from the seeds of *Raphanus*. The chaulmugra-oil contained in the seeds of the species *Gynocardia* and *Hydnocarpus* is active against leprosy and tuberculosis [3, 12]. Data referring to the secretion of the active substances of seeds under natural conditions are to be found only occasionally in the literature. MAKSIMOV [20] in his widely known text-book of plant physiology mentions, without reference to data that certain seeds in swollen state are capable of germinating over years in the soil because they discharge antimicrobial substances in their immediate environment. In the course of our examinations on the physiology of germination we have consistently observed that, in case of a protracted germination, the seeds, according to species, mould in a different degree. The seeds of certain species are intensely attacked by mould-fungi, while those of other species are attacked only slightly, or not at all (Figs. 1 and 2). The same refers also to bacteria.

It is a well-known fact that from the point of view of plants the antibacterial and antifungal compounds of the vegetative parts are essential for

the protection against pathogenes [10, 24]. It may be justly supposed that certain plant species influence the microflora of their environment not only in their developed state, but through their compounds which diffuse through the seed-coat as early as at the time of the swelling of the seed.

In order to verify this hypothesis we observed the action exercised by the seeds of numerous plants, and by their fruits in some cases, on the terricolous bacteria.

Methods and materials

In the course of the examinations the method to be followed was determined by the undermentioned conditions : 1. ensuring the interaction of the seed to be examined and the bacterium strain in question ; 2. providing as far as possible the most favourable lifeconditions for both organisms ; 3. sensitivity and rapidity of the method ; 4. utilization of a moderate amount of material.

The above requirements are best met by the agar cultures, because on the one hand they assure the swelling of seeds and the diffusion of the presupposed active substances, and on the other, they constitute the optimal substratum for test organisms.

In the case of the presence and release of an inhibitor, the bacterial strain spread on the agar plate is not able to propagate in the diffusional zone around the seeds and so the concentric extinction zone develops.

The experiments were instituted in Petri-dishes at a pH of 7 in 2 per cent agar broth. In each case a fresh 24-hour old bacterium suspension was spread over the solid 5 mm thick nutrient agar plate, and, subsequently, after the removal of the surplus and the drying up of the surface, the seeds were half sunk into the culture medium. The temperature of incubation was 30 °C. The appreciation of the cultures ensued 20 hours after drying up. We reckoned with the disturbing effect of antagonistic bacteria strains introduced occasionally with the seeds, but, as it was proved in many experiments, this is wholly negligible if the test organisms — like in the present experiments — belong to rapidly propagating strains. Isolating examinations, into which we did not enter in detail in this paper also confirm the accuracy of this statement, since an extinction zone arose only around the seeds of such plant species from which we actually succeeded in extracting subsequently the active principles.

The tests were performed with whole seeds and fruits because it was the natural process of germination that was in our mind. The only exception was the species *Fraxinus* whose seed was sunk transversally halved into the agar plate, in order to ascertain whether the inner inhibitor compound which inhibits germination also influences the propagation of bacteria strains. The seeds employed in the experiments originated from the crop of the preceding year. The tests were carried out in three parallel sets of experiments with 5 to 10 seeds per case and per plant species.

With the method described above we have observed the action of the seeds and fruits of 512 higher plant species and varieties belonging to 88 families.

6 terricoline saprophyte, respectively phytopathogene bacteria were used as test organisms : the Gram-positive *Bac. cereus*, var. *mycoides*, *Bac. megatherium* 208, *Bac. subtilis* and the Gram-negative *Aerobacter aerogenens*, *Erwinia carotovora* and *Xanthomonas malvacearum*.

Results

From among the examined seeds and fruits those which gave positive results are summarized in the table. At the appreciation only those cases were considered as positive in which the zone was of a measurable size and was limited by a circular sharp line. The zone particulars are given in the mean distance of the colony located nearest to the seed.

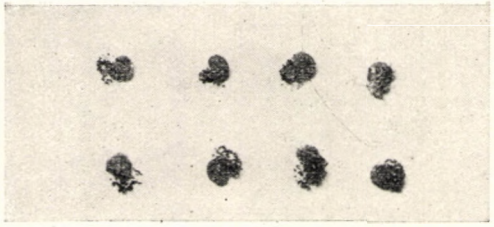


Fig. 1. Datura stramonium L. attacked by mould colonies

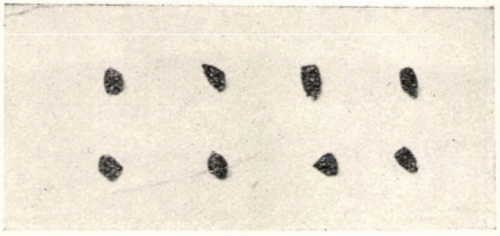


Fig. 2. Seeds of *Consolida orientalis* SCHÖD. free of mould-colonies

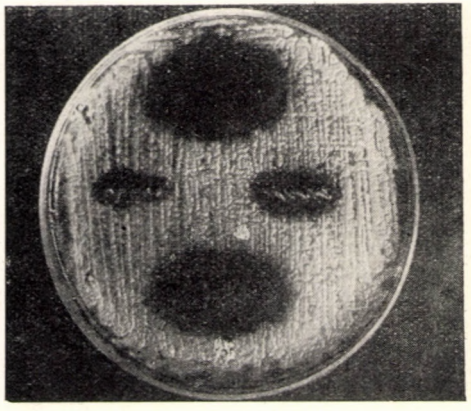


Fig. 3. Antibacterial effect of seed on *Bac. cereus* var. *mycoides* FLÜGGE. 1. *Kniphofia uvaria* HOOK. 2. *Atriplex nitens* SCHK. 3. *Angelica silvestris* L. 4. *Rhus typhina* TORN.

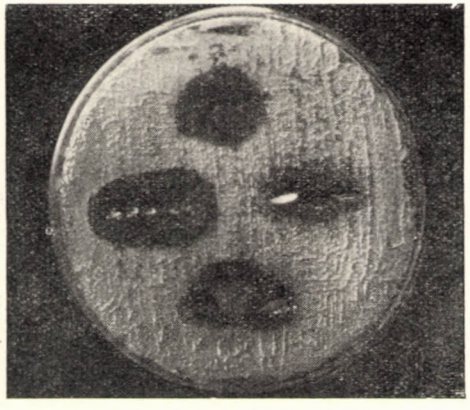


Fig. 4. Antibacterial effect of seeds on *Bac. cereus* var. *mycoides* FLÜGGE. 1. *Erodium moschatum* HERIT. 2. *Juniperus virginiana* L. 3. *Maclura aurantiaca* NUTT. 4. *Aristolochia clematitis* L.

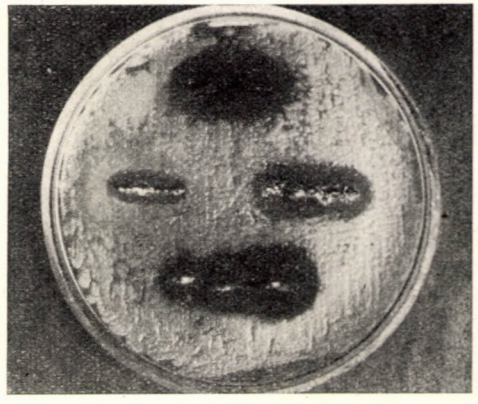


Fig. 5. Antibacterial effect of seeds on *Bac. cereus* var. *mycoides* FLÜGGE. 1. *Kniphofia aloides* MNCK. 2. *Atriplex hortensis* L. 3. *Cannabis sativa* L. 4. *Aristolochia fimbriata* CHAM.

Table 1

Name of plant	Radius of the sterile zone in mm					
	Bac. cereus var. *mycoides*	*Bac. megatherium* 208	*Bac. subtilis*	*Aerobacter aerogenes*	*Erwinia carotovora*	*Xanthomonas malvacearum*
Abietaceae						
**Abies alba* MILL	5	6	4	—	—	—
**Picea alba* L.	1	1	—	—	—	—
**Picea excelsa chlorocarpa* BUK	1	2	1	—	—	—
**Pinus nigra* L.	2	2	3	—	—	—
**Pinus strobus* L.	3	4	2	—	—	—
**Pseudotsuga douglasii* Carr.	2	1	1	—	—	—
**Pseudotsuga taxifolia* (LAMB.) BRITTON	3	3	3	—	—	—
Amaranthaceae						
**Amaranthus albus* L.	1	—	—	—	—	—
**Amaranthus ascendens* LOIS.	1	—	—	—	—	—
Anacardiaceae						
***Rhus glabra* L.	7	8	5	4	6	5
***Rhus typhina* TORN.....	6	6	4	3	4	2
***Rhus laciniata* COW.....	7	9	7	4	6	4
Aristolochiaceae						
**Aristolochia clematitis* L ..	6	5	8	—	—	—
**Aristolochia fimbriata* CHAM	5	3	7	—	—	—
Caprifoliaceae						
**Lonicera alpigena* L.	3	2	3	1	2	1
Chenopodiaceae						
* *Chenopodium album* L. ..	2	1	1	—	—	—
* « *bonus* HENR. .	2	2	2	—	—	—
* « *polyspermum* L.	3	3	2	—	—	—
* « *urbicum* L.	1	1	2	—	—	—
**Atriplex hortensis* L.	4	4	5	—	—	—
**Atriplex nitens* SCHK. ...	4	4	5	—	—	—
**Kochia scoparia* SCHRAD. .	3	2	3	—	—	—
Compositae						
***Xanthium italicum* MOR...	3	—	2	—	—	—
***Xanthium strumarium* L. .	4	1	3	—	—	—
Cupressaceae						
**Biota orientalis* (L.) ENDL.	1	—	1	—	—	—
***Juniperus chinensis* L.....	5	5	5	—	—	—
***Juniperus virginiana* L. ..	7	7	6	—	—	—
**Thuja occidentalis* L.	2	2	1	—	—	—
Geraniaceae						
***Erodium moschatum* (L.) HERIT.	8	5	7	—	—	—
Guttiferae						
**Hypericum elegans* STEPH...	5	4	5	—	—	—
Labiatae						
**Stachis annua* L.	2	—	2	—	—	—
Liliaceae						
**Kniphofia aloides* MNCK. .	6	6	4	—	—	—
**Kniphofia hybrida Express hort.*	7	7	4	—	—	—
**Kniphofia praecox* hort....	8	8	6	—	—	—
**Kniphofia tuckii* BAK. ...	8	8	6	—	—	—
**Kniphofia uvaria* HOOK. .	8	8	6	—	—	—
Moraceae						
**Cannabis sativa* L.	3	1	3	—	—	—
**Humulus lupulus* L.	4	4	7	—	—	—
**Maclura aurantiaca* NUTT.	3	3	3	—	—	—

Name of plant	Radius of the sterile zone in mm					
	Bac. cereus var. *mycoides*	*Bac. megatherium* 208	*Bac. subtilis*	*Aerobacter aerogenes*	*Erwinia carotovora*	*Xanthomonas malvacearum*
Oleaceae						
**Fraxinus excelsior* L.	4	3	2	—	2	1
**Fraxinus pennsylvanica* MARSH.	2	2	2	—	2	1
Papaveraceae						
***Macleya cordata* R. BR. ..	5	4	5	—	—	—
Primulaceae						
**Primula veris* v. *suave olens* RCHB.	1	1	—	—	—	—
Ranunculaceae						
**Consolida ajacis* SCHURR. .	1	1	3	—	—	—
**Consolida orientalis* SCHÖD.	4	3	4	—	—	—
**Consolida regalis* L.	2	2	3	—	—	—
**Nigella damaschena* L.....	2	—	—	—	—	—
Umbelliferae						
***Angelica silvestris* L.	5	5	3	—	—	—
***Pastinaca sativa* L.....	3	3	1	—	—	—
***Petroselinum hortense* HOFFM.	4	3	1	—	—	—
Verbenaceae						
**Verbena canadensis* BRITTON	2	2	2	—	—	—
**Verbena officinalis* L.	2	2	2	—	—	—

* Active substance to be found in the seed.
** Active substance to be found in the fruit.

Discussion

It will be seen from the Table 1 that in the majority of active seeds an *extinction zone* develops only in the case of Gram-positive microorganisms, hence the effect of the inhibiting compounds is in most cases selective. Tests effected with pathogene strains, not specified here, confirm this statement. The inhibitor occurring in the seeds of the species *Lonicera* and *Fraxinus* and in the fruit-shell of the *Rhus* species equally inhibits the propagation of the strains belonging to both groups.

Such close connection as in the case of other active principles cannot by far be established in the distribution per families of antibacterial compounds.

The species of the families *Abietaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cupressaceae* and *Moraceae* are active in a relatively large number, yet even within these families not all species are active. In other families the restriction of antibacterial compounds to certain species only is still more conspicuous. So for instance in the family of the *Liliaceae* only the seeds of the *Kniphofia*-species evolve a quenching zone. Among the *Rhus* species only those possessing a red seed-coat are active, while those with a yellow one *(R. toxicondendron, R. vernix)* are not active at all.

Although the size of zones does not depend on the efficacy of the discharged compounds only, but also on other factors, nevertheless it is note-

worthy that the *Abies alba*, *Aristolochia*, *Juniperus*, *Kniphofia* and *Rhus* species and *Erodium moschatum* give a relatively large zone (Figs. 3—5).

In several cases the degree of activity varies according to plant individuals. In certain species *(Aristolochia, Consolida)* the action of seeds collected from the different individuals varies widely. In the following it seems worth while to investigate the relation between the content in active substance and the internal and external influencing factors. In the majority of species, however, the efficacy is approximately identical; the seeds of the *Fraxinus* species give positive results; nevertheless, an extinction zone appears characteristically only beside that part of the seed which is contiguous to the embryo.

The seeds of the well-known plants containing an inhibitor *(*e. g.*Ranunculaceae, Liliaceae)*, moreover the seeds certainly containing antibacterial compounds *(Cruciferae)* do not show positive results either. The reason for this is to be sought in the fact that their active substances are only released due to the effect of maceration and in many cases to the subsequent ferment activity. Under natural conditions they do not permeate through the seeds, thus they do not develop an extinction zone. In the cases observed by us the antibacterial compounds diffusing also under natural conditions were localised in the layers near to the surface, in most cases in the seed-coat.

REFERENCES

1. Boas, F. (1949) Dynamische Botanik. Henser Verlag, München.
2. Crocker, W., Barton, L. V. (1953) Physiology of Seeds. Chronica Botanica, Waltham.
3. Culpepper, W. L., Ableson, M. (1921) Chaulmoogra oil in the treatment of tuberculosis. *J. Lab. Clin. Med.*, **6**, 415—419.
4. *Дуброва, Г. В.* (1952). Действие фитонцидов некоторых растений на плесневые грибы. *Фитонциды*, 15—20, Акад. Мед. Наук СССР, Москва.
5. Evenari, M. (1949) Germination inhibitors, *Bot. Rev.*, **15**, 153—194.
6. Frisbey, A., Roberts, J. M., Jennings, J. C., Gottshall, R. Y., Lucas, E. H. (1953) The occurrence of antibacterial substances in seed plants with special reference to *Mycobacterium tuberculosis*. III. IV. *Quart. Bull. Mich. Agr. Expt. Sta.*, **35**, 392—404.
7. Gottshall, R. Y., Lucas, E. H., Lickefeldt, A., Roberts, J. M. (1949) The occurrence of antibacterial substances active against *Mycobacterium tuberculosis* in seed plants. *J. Clin. Invest.*, **28**, 920—923.
8. *Граменицкая, Б. Г.* (1952). О фитонцидных свойствах некоторых растений. *Фитонциды*, 86—98, Акад. Мед. Наук СССР, Москва.
9. Hayes, L. E. (1947) Survey of higher plants for presence of antibacterial substances. *Bot. Gaz.* **108**, 408—414.
10. *Хетагурова, Ф. В.* (1952), Влияние фитонцидов на фитопатогенные бактерии. *Фитонциды*, 21—33. Акад. Мед. Наук СССР, Москва.
11. Horváth, I., Ivánovics, Gy. (1949) Über antibiotische Substanzen der Cruciferae. Experientia, **5**, 74.
12. Issekutz, B. (1954) Gyógyszertan. Pharmacology. Egészs. Kiadó, Budapest (In Hungarian.)
13. Ivánovics, Gy., Horváth, I. (1947) Raphanin, an antibiotical principle of the radish (*Raphanus sativus*). *Nature*, **160**, 297.
14. *Канода, Н. З.* (1952), О фитонцидных свойствах некоторых растений Туркменской ССР. *Фитонциды*, 114—118. Акад. Мед. Наук, Москва.
15. Klosa, J. (1952) Antibiotika. Verlag Technik, Berlin.
16. Köhler, H. (1954) Biologische Arbeitsmethoden der Antibiotikaforschung. *Nachr. Deutsch. Pflschutzdienst*, **8**, 1—9.

17. *Круглова, В. М.* (1952) О фитонцидах водных растений. *Фитонциды,* 138—144. Акад. Мед. Наук СССР, Москва.

18. Little, J. E., Sproston, T. J., Foote, M. (1948) Isolation and antifungal action of naturally occurring 2-methoxy-1,4-naphthoquinone. *J. Biol. Chem.*, **174,** 335—342.

19. Lucas, E. H., Lickefeldt, A., Gottshall, R. Y., Jennings, J. C. (1951). The occurrence of antibacterial substances in seed plants with special reference to Mycobacterium tuberculosis. *Bull. Torr. Bot. Club*, **78,** 310—321.

20. *Максимов, Н. А.* (1948). Краткий курс физиологии растений. Сельхозгиз, Москва.

21. Osborn, E. M. (1943) On the occurrence of antibacterial substances in green plants, *Brit. J. Expt. Path.*, **24,** 227—231.

22. Sanders, D. W., Weatherwax, P., Mc Clung, L. S. (1945) Antibacterial substances from plants collected in Indiana. *J. Bact.* **49,** 611—615.

23. *Щемякин М. М., Хохлов А. С.* (1953) Химия антибиотических веществ. Госхимиздат, Москва—Ленинград.

24. *Токин Б. П.* (1951) Фитонциды. Акад. Мед. Наук СССР, Москва.

25. Uri, J., László, I. (1952) Debrecen környéki növények phytoncid tulajdonsága. Phytoncid properties of plants in the environment of Debrecen. *Kisérl. Orvostud.*, **4,** 434—435. (In Hungarian.)

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА В СЕМЕНАХ И ПЛОДАХ

При исследовании действия неповрежденных семян (и в некоторых случаях — плодов) 512 видов или же сортов 88 растительных семейств на почвенные бактерии агарно-диффузионным способом было установлено, что семена или плоды 52 видов или сортов 19 семейств содержат антибактериальные вещества. Их действие направлено прежде всего против грамположительных видов. В распределении действующих принципов по семействам определенных связей не было обнаружено. Внутри отдельных видов растений содержание ингибитора проявляет индивидуальное варьирование, — по всей вероятности в зависимости от возраста или действия среды — а у других видов оно почти постоянное. В наблюдаемых автором случаях антибактериальные вещества локализированы, за исключением видов *Fraxinus* в семенной оболочке и в наружном слое плодов.

VORKOMMEN VON ANTIBAKTERIELLEN VERBINDUNGEN IN SAMEN UND FRÜCHTEN

Der Verfasser untersuchte im Wege der Agardiffusion die auf Bodenbakterien ausgeübte Wirkung der unbeschädigten Samen und in einigen Fällen der Früchte von zu 88 Pflanzenfamilien gehörigen 512 Arten bzw. Sorten. Im Laufe der Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Samen bzw. Früchte von 52 Arten und Sorten von 19 Familien antibakterielle Verbindungen enthalten. Die Wirkung richtet sich in erster Linie gegen die Gram-positiven Arten. In der Verteilung der Wirkstoffe je nach Familien, sind keine entschiedenen Zusammenhänge zu beobachten. Innerhalb der einzelnen Pflanzenarten — wahrscheinlich vom Lebensalter und von den Umweltsfaktoren abhängig — variiert bei einzelnen der Inhibitoreninhalt, bei anderen hingegen weist et beinahe Ständigkeit auf. In den beobachteten Fällen sind die antibakteriellen Verbindungen mit Ausnahme der *Fraxinus*-Arten in der Samenschale und in den äusseren Schichten der Früchte lokalisiert.

Lajos Ferénczy, Institute of Plant Physiology of University, Szeged, 428., Hungary.

EFFECT OF NARCOTICS AND OTHER POISONS ON THE WATER-RETAINING CAPACITY OF DETACHED LEAVES

L. J. M. FELFÖLDY

BIOLOGICAL RESEARCH INSTITUTE OF THE HUNGARIAN ACADEMY OF SCIENCES, TIHANY (HEAD: B. ENTZ)

(Received May 18, 1955)

Summary

We studied the effects of some poisons (narcotics), acting in gaseous form, on the water-retaining capacity of detached leaves of *Chenopodium album*, *Portulaca oleracea*, *Convolvulus arvensis* and other weeds.

The chloroform treatment inhibited the desiccation resistance of detached leaves, in the case of most plants. This inhibitory effect did not decrease either by the mucilage content of the leaves or by their hairiness. Chloroform did not effect the leaves of *Chenopodium album* when it was saturated with water, whereas the chloroform-resistance of *Chenopodium* leaves ceased after the loss of cca. 20 per cent of its water content.

The experimental results emphasize the role of metabolism of living epidermal cells in the development of water-retaining power. On the other hand the example of *Chenopodium album* shows the importance of the plasma structure, suggesting the existence of a hydrophilic layer on the lipoid one in the ectoplasm of the water-saturated leaf cells.

In our experiments dealing with the water relations of plants there came more and more to the fore the supposition that the living plasm of living epidermic cells plays a role in the development of water-retaining power of detached leaves. It is the simplest to compare the living and dead leaves in order to find out the function of metabolism in the development of desiccation resistance.

We could not kill the leaves by heat, boiling water or poisons dissolved in water without causing significant changes in their moisture content, therefore we tried to kill the leaves rapidly with narcotics or other poisons, acting in gaseous form.

Materials and methods

The plant to be investigated was pulled up by the roots (or large branch cut off) and in the cool, well-regulated temperature of the laboratory we plucked from it one or more medium-sized leaves in about uniform state of development. From these we cut out with a 15 mm ∅ cork borer three or five discs for each treatment. The discs were thoroughly mixed together, they were then divided into groups of three or five pieces, and were poisoned in Petri-dishes, at laboratory temperature, in an atmosphere saturated with the posion in question. The control discs were incubated for the same period in clean Petri-dishes. The groups were measured both before and after poisoning on a torsion balance to an accuracy of 0,1 mg.

After the poisoning the discs were put into open embryum dishes, spread out so that none of them covered the other, then we began to dry them with an electric hair-drier, set up in advance. The hair-drier was adjusted so that a thermometer placed among the dishes on white filter paper showed a temperature of 30—32° C. The drying was interrupted at intervals of 20 minutes (in special cases 30) and the weight of the discs measured. The duration of the experiments was 6 to 10 times 20 (or 30) minutes. The results are drawn on a graph constructed similarly to those used for the desiccation curves, i. e. the percentage of water content, calculated to dry substance dried at 105° C after the experiment, is taken as ordinate.

Experimental results

Fig. 1 shows the result of the first experiment. From the curves of the control graph (II, IV, VI) can be seen the typical desiccation velocities of the three plants: *Portulaca* is the slowest, *Chenopodium album* is in the middle, and *Convolvulus* dries the most rapidly. It can also be seen that *Portulaca* (I) and *Convolvulus* (V) lose their water-retaining capacity under the effect of chloroform poisoning. This is not to be seen in the desiccation curve of the poisoned *Chenopodium album* (III), though this too fell lower than the control curve (IV).

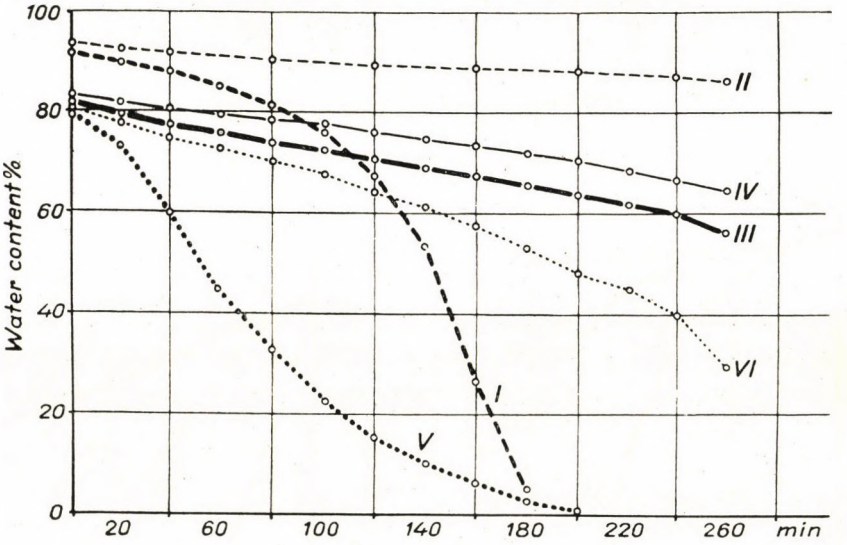


Fig. 1

In Figs. 2—4 may be seen the effect of different poisons, acting in gaseous form, on the water-retaining capacity of leaves plucked from the three test plants. Among them we see again in the curves of *Chenopodium album* (Fig. 2) the slight effect of chloroform (IV), the equally ineffective formaldehyde (III) and the much more injurious carbol gas (II). It is chloroform that cripples the water-retaining capacity of leaves of the other two plants the most (Figs. 3 and 4); the effect of the other two poisons falls between the chloroform and the control curves. From these experiments it is evident that the effects which result in an alteration of water-retaining capacity depend upon the different characteristics of the poisons.

As a preliminary we studied the CO_2-liberation of plucked leaves. The experimental method being contestable [8, p. 133] we prefer not to give nume-

rical data. It can, however, be stated without misgivings that half an hour's poisoning did not in a single case arrest the liberation of CO_2, in fact it was capable of causing a slight rise ; whereas a chloroform-treatment, lasting for

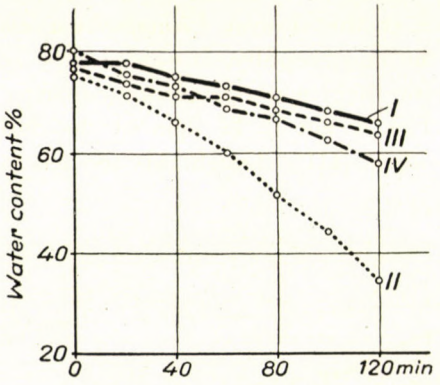


Fig. 2. Chenopodium album

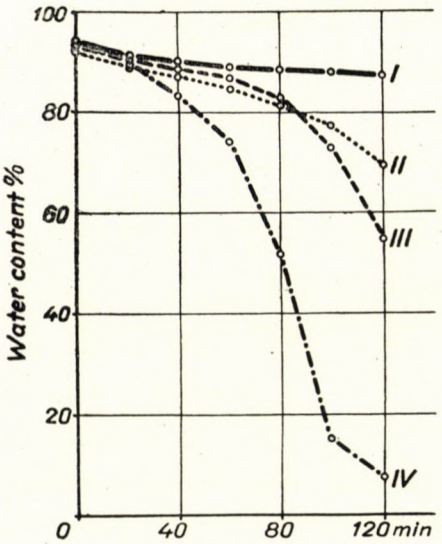


Fig. 3. Portulaca oleracea

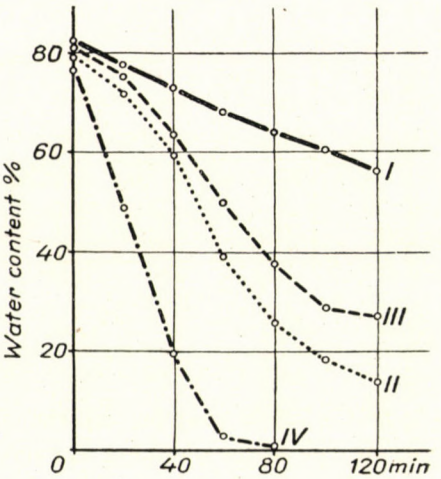


Fig. 4. Convolvulus arvensis

Fig. 2—4. Desiccation curves of the leaves of our three test plants plucked in the morning and treated with phenol (II), formaldehyde (III) and chloroform (IV), compared with control leaves (I)

one hour results in what may be said to be complete cessation of carbon dioxide liberation. But as far as water-retaining action is concerned, even the half-hour treatment is effective. Considering that there is a correlation between tissue respiration and water-retaining capacity [2, 9, 10], further research in this direction does not seem uncalled for, all the more as the irregular behaviour

of *Chenopodium album* holds out promise of new experimental possibilities. It should also be mentioned that even a half-hour's treatment with any of the poisons mentioned completely arrests the plasmolyzability, with 0,8M cane sugar solution, of the epidermic cells and of the guard cells of stomata of the planst investigated by us *(Chenopodium hybridum, Convolvulus arvensis, Clematis vitalba, Hyoscyamus niger, Parietaria officinalis, Plantago major, Solanum nigrum)*.

To avoid showing the effects of the different poisons on different plants each on different graphs, we attempted to express the results numerically, by subtracting the percentage value of the water content of the treated leaves from the percentage value of the water content of control leaves at the end of the 6th 20-minute desiccating period. This, in the case of *Chenopodium album*, for example, in Fig. 2, is : after chloroform 7,0, formaldehyde 2,0, carbol 30,9, and so forth. For this method to be really useful, the drying must, of course, be made under the same conditions and the times of measuring must be punctually maintained. The greater the percentual difference between the values of the water content of the control leaf and the water content of the poisoned leaf, the more has the treatment diminished the leaf's water-retaining capacity.

From the data in Table 1, based on the behaviour in respect to chloroform, it may be useful to set up two groups, one containing plants whose water-retaining capacity is not affected catastrophically by chloroform *(Chenopodium album, C. hybridum, Solanum nigrum)*, and another in which we find all the other plants we have investigated, where water-retaining capacity is lost under chloroform-treatment.

Table 1

Percentual difference in the water content of leaf discs of some plant species treated with different poisons, as against control discs, after the 6th 20 minutes
(July 3rd to 7th, 1954; gathered at 7 a. m. ; each number the mean of 5 parallel experiments.)

	Chloroform	Carbol	Formaldehyde
Arctium lappa	23,3	10,3	— 0,7*
Chenopodium album	7,0	30,9	2,0
C. hybridum	5,6	37,1	17,6
Convolvulus arvensis	51,7	41,2	34,3
Hyoscyamus niger	24,6	19,4	6,5
Onopordum acanthium	47,7	9,8	38,8
Physatis alkekengi	14,2	2,0	— 0,6*
Plantago major	48,2	28,3	39,5
Portulaca oleracea	79,5	17,3	32,6
Solanum nigrum	7,3	6,1	46,4

* The minus sign means that the control curve falls below the treated, i. e. the treatment is ineffectual.

These regularities were naturally not established on the basis of one or two experiments. We made particularly many on *Chenopodium album* because of its "chloroform resistance". We give as example the results of poisoning the leaves of different insertion on the stalk of plant. The experiment was made on leaves of *Chenopodium album* gathered at 6 a. m. on August 2, 1954. The numbers, as in Table 1, mean the percentual difference, between chloroformed and control leaves, in water content found at the end of the 6th 20 minutes after poisoning (Table 2).

Table 2

Percentual difference in the water content of Chenopodium album leaves of different insertion poisoned by chloroform, as opposed to control leaf discs

Place of leaf on stalk	Percentage of difference in water content
Lower stalk leaf (2nd from bottom)	1,6
Middle « « (9th)	10,4
Upper « « (17th)	2,4
Top « « (19—21st)	1,9
Lower branch leaf (medium-sized branch)	5,1
Upper « « (the same)	6,6

From the data — comparing them with the numerical values in Table 2 — *Chenopodium album* is obviously "chloroform resistant".

Nevertheless, one of our experiments made on leaves of *Chenopodium album* gathered at noon, gave contradictory results, the chloroform producing a decided diminishing effect on the water-retaining capacity (chloroform = 23,1 ; carbol = 9,3 ; formaldehyde 37,5). On repeating several times the poisoning of leaves gathered in the morning and at noon, we found that the insensibility of *Chenopodium album* leaves to chloroform appears consistently only in the leaves gathered in the morning. It is our hypothesis that this is caused by variations in the degree of hydratation in the cell plasma of the leaf epidermis.

We pursued this question by means of a simple series of experiments. Medium-sized leaves from all three test plants, gathered in the morning, were saturated with water for 24 hours in a moist chamber. Discs were then cut out of them in the usual manner and the poisoning, combined with drying, carried out. The discs were divided into groups I to VI. The first group we poisoned as usual at 0 minutes, the others being left in clean Petri-dishes. Group II was poisoned after 30 minutes' drying, group III after 60 minutes, and so on. The results are graphed in Figs. 5—7.

In these drawings it is apparent that the curves of the leaves of *Chenopodium album* saturated with water and simply dried (I) do not differ to any extent from those of leaves poisoned when in a completely saturated state (I, II, IV), whereas, after more extensive water loss (68, 64, 61% water content

as opposed to the earlier 84, 80 and 74% values) the chloroform produces its usual decreasing effect on water-binding capacity. In *Portulaca* and *Convolvulus* this difference between the saturated and dried leaves cannot be observed.

These poisoning experiments in connection with fractionated drying

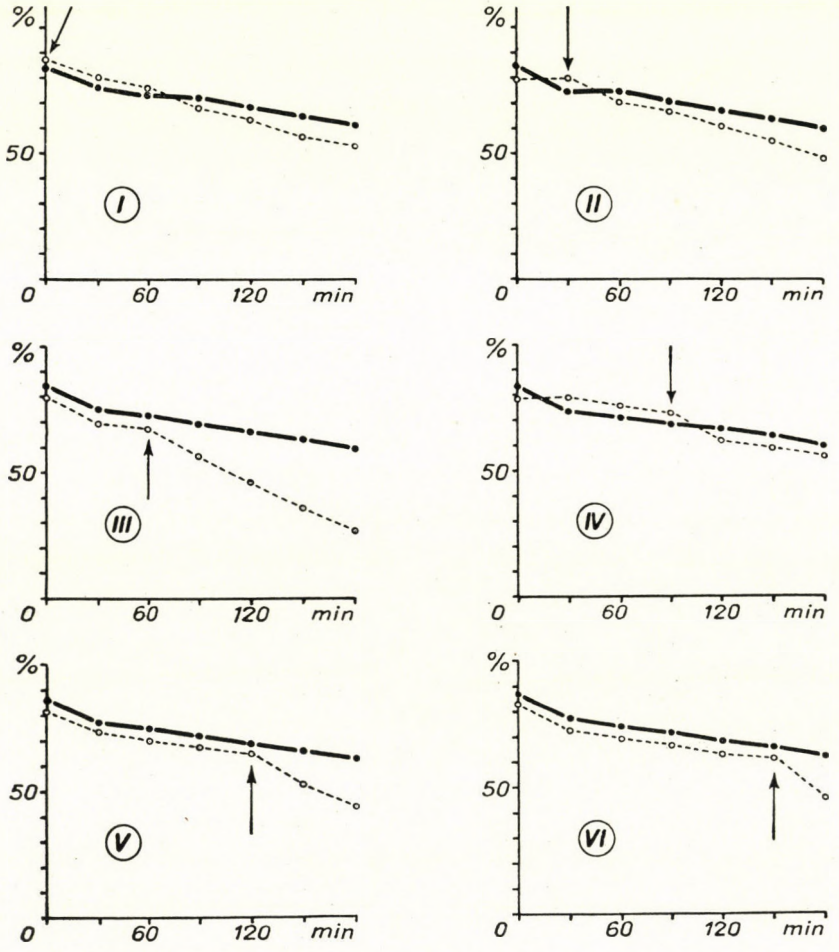


Fig. 5. The effect of chloroforming at different stages of dehydration in the water-saturated leaves of *Chenopodium album*. Black line=control; dotted line=treated leaves; the time of poisoning is shown by a little arrow. Ordinate: per cent of water content.

turned our attention — aside from the importance of the variations in water content — to a study of the significance of the epidermis, which has already been emphasized by others (e. g. ABOU-RAYA [1]).

We made two experiments on these lines by peeling the epidermis from the leaves or by splitting them. One experiment was made on *Portulaca*, the other on *Chenopodium album*. The vigorous water-retaining capacity of *Portu-*

laca was hitherto explained as due to its mucous content; the behaviour of *Chenopodium* interested us because of its special peculiarities.

The *Portulaca* experiment is graphed in Fig. 8, that of *Chenopodium album* in Fig. 9. It may be said that removal of the epidermis leads to complete

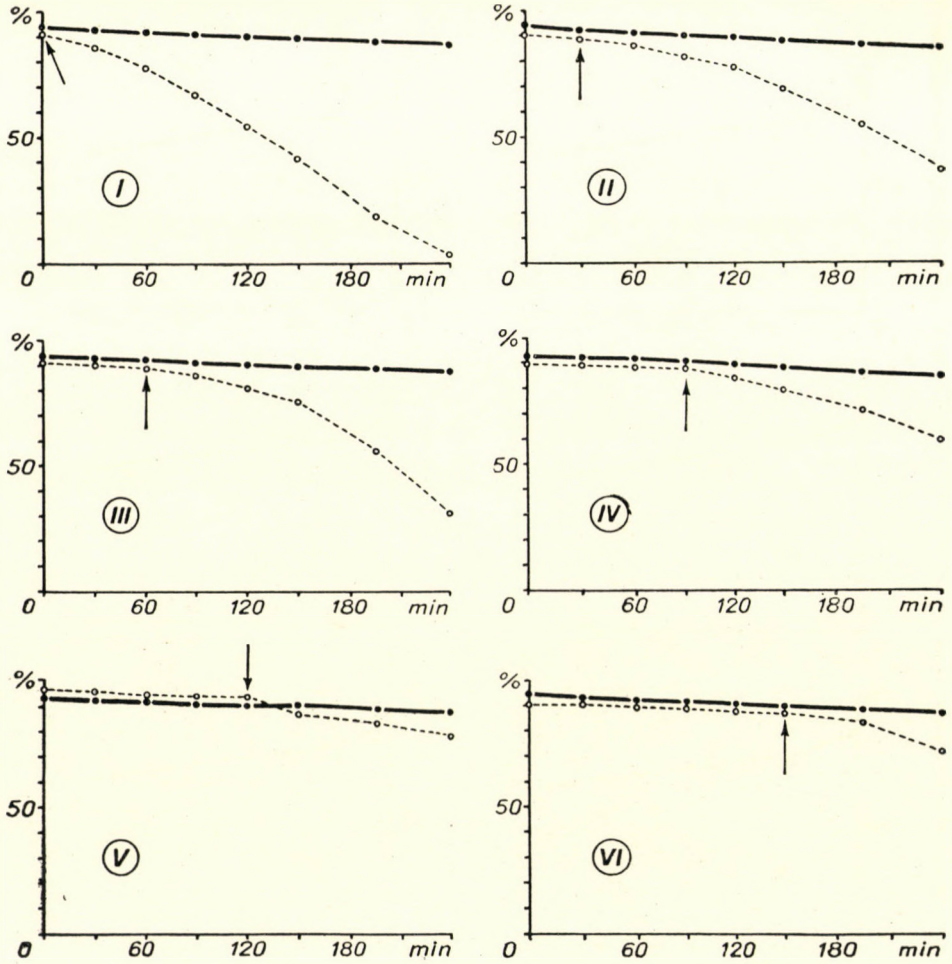


Fig. 6. The "fractional poisoning" of water-saturated leaves of *Portulaca oleracea* (see explanation under Fig. 5.)

cessation of water-retention in both plants. The mucous content of *Portulaca* did not alter the situation in the least, hence when *Portulaca* is poisoned by chloroform, then, similarly, it is primarily the epidermal cells that can be injured; the resistance of *Chenopodium* is likewise hidden in the cells of the living epidermis.

Here we shall speak of the experiments made on the evaporation-decreasing role of a thickly hairy covering. During our transpiration measurements it

was already evident that one of the hairiest plants in our flora, *Verbascum phlomoides*, transpired very rapidly, notwithstanding its luxuriant hairiness; perhaps the hairiness even increased its water-losing capacity (comp. STRUGGER [11, p. 205]).

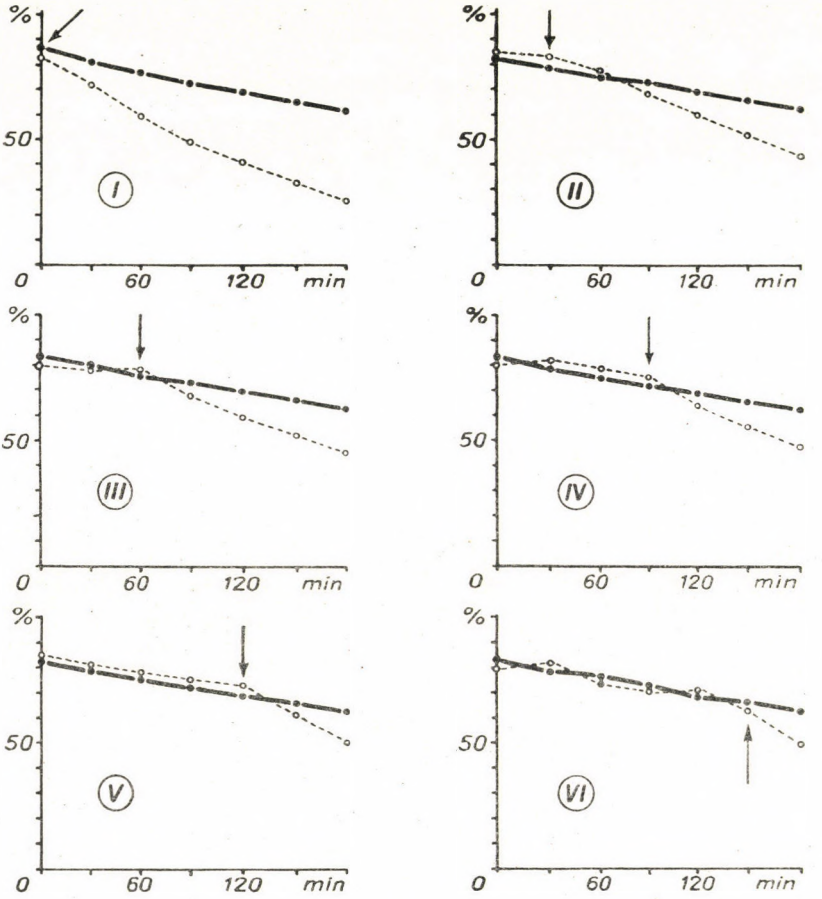


Fig. 7. The "fractional poisoning" of water-saturated leaves of *Convolvulus arvensis* (see explanation under Fig. 5.)

If we consider the data on hairy species (Table 3) together with the values for *Portulaca* and *Chenopodium album* given for comparison, we see that there are no plants with really good water-retaining capacity among the hairy-leaved. Neither is their resistance to drought connected with their hairiness, for chloroform, which affects the living plasma, was very effective on all of them. The water retention of *Arctium lappa*, which has hairs only on the under side was relatively the least changed by the poison, the difference in percentage of water content between control and poisoned discs at the end of the 6th 20

minutes being least : 23,3%. Though this is a species with very poor water retention (it lost the most water during the 6 × 20 minutes : 24,0%). On the basis of the data in the literature and our results, hairiness as a device for reducing evaporation (or transpiration) takes a back seat as compared with the plasmatic activities of the epidermal cells.

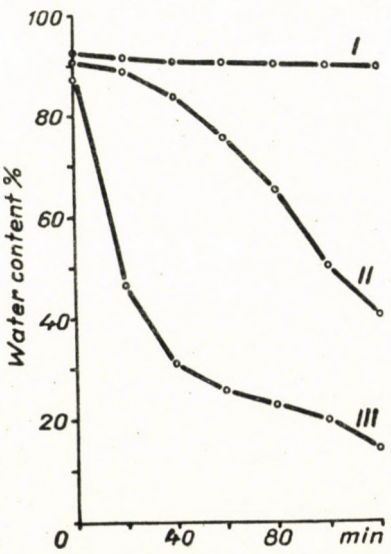


Fig. 8. The desiccation curves of *Portulaca oleracea* leaves untreated (I), poisoned with chloroform (II) and stripped (III)

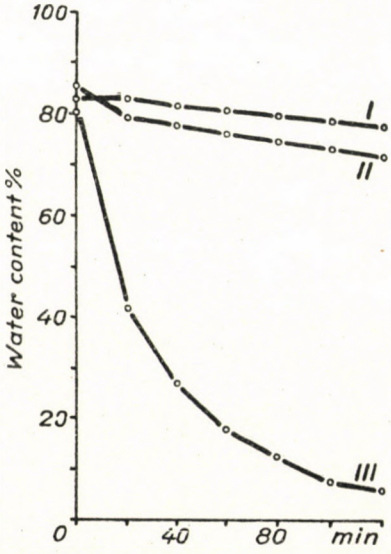


Fig. 9. The desiccation curves of *Chenopodium album* leaves untreated (I), poisoned with chloroform (II) and stripped (III)

Table 3

Sensitivity to chloroform of hairy-leaved plants as compared with two test plants

Species	% of water content given off in 6×20 min.		Difference in % of water content at the end of the 6th 20 min.
	control	chloroformed	
Onopordum acanthium	13,2	61,1	47,7
Arctium lappa	24,0	48,4	23,3
Verbascum phlomoides	15,9	60,8	46,0
Portulaca oleracea	3,9	84,0	79,5
Chenopodium album	7,3	12,5	5,2

Considering the effect of chloroform on augmentation of water permeability* (HÖFLER and WEBER [7], DÉRRY [3], DEYSSON [4], and so on) and the foregoing detailed exposition, we tried to revert this question to the plasma of the epidermal cells of the leaf, and were thus obliged to investigate the permeability relations of the epidermal cells of different species.

* GANZINGER [6] reports on the effect that hexametilentetramin has on increasing the permeating capacity of plasma, this differing in extent according to species.

Discussion

The velocity of desiccation of plucked leaves varies ; it can be influenced by poisons (narcotics) acting in gaseous form, all of them accelerating the desiccation. This is due to a correlation between the water-retaining capacity and the survival systems in the leaf.

Different plant species are injured in different ways by the different poisonous gases. Among the species investigated, with the exception of *Chenopodium album*, *C. hybridum* and *Solanum nigrum*, chloroform did the greatest injury to all the plants : it inhibited the water-retaining capacity the most.

Our experiments have proved that the chloroform resistance of *Chenopodium album* depends on the state of saturation of the leaf : the completely, or at least abundantly saturated leaves (with 84—74% water content) are not affected by chloroform, whereas the water-retaining capacity of the leaf tending towards desiccation (68—61%) decreases markedly after 30 minutes chloroforming. This change is not to be seen in *Portulaca* and *Convolvulus* ; they are sensitive to chloroform, no matter what their water content.

In view of the fact that the 30-minute treatment did not kill the leaves, though it seriously affected their water-retaining capacity, it occurred to us that the poisonous gases might cause changes in the epidermis. We then made experiments to see to what extent water-retaining capacity alters in leaves without their epidermis. Here we found that both *Portulaca oleracea*, in which the ample mucilage content of the cells was hitherto considered as the fundamental cause of its capacity for water retention, and *Chenopodium album*, when deprived of their epidermis, both completely lose this capacity. Our poisoning experiments proved that the role of hairs, often mentioned in the literature as diminishing evaporation, is far subordinate in importance to the water-retaining capacity of uninjured epidermal cells.

On the basis of our results thus far it was the chloroform resistance of *Chenopodium album* that seemed chiefly worthy of further study. Knowing that chloroform injures the lipo-proteids of the surface layer of plasm by dissolving their lipophile groups or by replacing the lipoid groups of the lipoproteids, increases plasma permeability [4], we thought that in the epidermal cells of the leaves of those plants which seem insensitive to chloroform when saturated with water there is either a double layer, one lipophile and over it a hydrophile, or that a mosaic of hydrophile and lipophile groups forms an exterior layer on their ectoplasm. In a well hydrated state the hydrophile groups seem to protect the lipoids from the action of the chloroform ; during the times of day, deficient in humidity again, these hydrophile groups liberate their water fairly rapidly. The lipoids then take over the chief role in the boundary-layer structure, and these are susceptible to injury by chloroform.

In view of the effect of chloroform in increasing water permeability, we consider water permeability of the living epidermal cell to be one of the causes of the great differences seen in the configuration of the desiccation curves, and it is this point that will have to be first of all subjected to closer study in the future.

REFERENCES

1. Abou-Raya, M. A. (1950) The rate of water-loss from stripped leaves. *J. exp. Bot.*, **1**, 322—328.
2. Bolli, M. (1951) The respiration in higher plants during fading. Experiences with tobacco. *Tabacco*, **55**, 326—338.
3. Derry, B. H. (1930) Plasmolyseform- und Plasmolysezeit-Studien. *Protoplasma*, **8**, 1—49.
4. Deysson, G. (1952) Recherches sur la permeabilité des cellules végétales. *Rev. Cytol. Biol. Végét.*, **13**, 153—315.
5. Felföldy, L. J. M. (1955) A letépett lomblevél kiszáradásmenetének élettani vizsgálata. Physiological experiments on the desiccation rate of detached leaves. *Annal. Biol. Tihany*, **23**, 111—154. (In Hungarian, with English summary.)
6. Ganzinger, K. (1939) Vergleichende Untersuchungen über die schädigende Wirkung von Hexamethylentetramin auf pflanzliche Zellen und über sein Permeirvermögen. *Biol. Gen.*, **14**, 587—619.
7. Höfler, K., Weber, F. (1926) Die Wirkung der Äthernarkose auf die Harnstoffpermeabilität von Pflanzenzellen. *Jb. wiss. Bot.*, **65**, 643.
8. Paech, K., Simonis, W. (1952) Übungen zur Stoffwechselphysiologie der Pflanzen. Springer, Berlin.
9. Parker, J. (1952) Desiccation in conifer leaves : Anatomical changes and determination of the lethal level. *Bot. Gaz.*, **114**, 189—198.
10. *Семихатова, О. А.* (1950) О взаимосвязи дыхания и водоудерживающей способности листьев растений. *Бот. Журн.*, **35**, 461—468.
11. Strugger, S. (1949) Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanzen. 2. Aufl. Springer, Berlin.

ДЕЙСТВИЕ НАРКОТИКОВ И ДРУГИХ ЯДОВ НА ВОДОУДЕРЖИВАЮЩУЮ СПОСОБНОСТЬ ОТОРВАННЫХ ЛИСТЬЕВ

Было исследовано действие ядов (наркотиков), действующих в газообразном состоянии на водоудерживающую способность листьев *Chenopodium album*, *Portulaca oleracea*, *Convolvulus arvensis* и других сорных растений.

Обработка хлороформом в большинстве случаев тормозит сопротивление высушиванию оторванных листьев. Это торможение не уменьшается ни содержанием слизи, ни опушенностью листьев. В случае насыщенности водой, хлороформ не действует на листья *Chenopodium album*, но после сдачи 20% водосодержания *Chenopodium* утрачивает свое сопротивление хлороформу.

На основании результатов опытов автор подчеркивает роль обмена веществ живых клеток эпидермиса в образовании водоудерживающей силы. С другой стороны, пример *Chenopodium album* указывает на значение структуры плазмы: предполагается гидрофильный слой на липофильной пограничной пленке эктоплазмы в насыщенных водой клетках.

DIE WIRKUNG VON NARKOTIKA UND ANDEREN GIFTEN AUF DIE WASSERZURÜCKHALTUNG VON GEPFLÜCKTEN BLÄTTERN

Der Verfasser untersuchte die Wirkung der in Gasgestalt wirkenden Gifte (Narkotika) auf die Wasserretentionsfähigkeit der Blätter von *Chenopodium album*, *Portulaca oleracea*, *Convolvulus arvensis* und anderen Unkrautpflanzen.

Im Falle der meisten Pflanzen verhindert die Chloroformbehandlung den Austrocknungswiderstand der abgepflückten Blätter. Weder der Schleimgehalt der Blätter, noch ihre Behaarung verringern diese hindernde Wirkung. Das Chloroform übt keine Wirkung auf die Blätter von *Chenopodium album* aus, wenn diese mit Wasser gesättigt sind, obgleich *Chenopodium* nach einer ungefähr 20%-igen Wassergehaltabgabe seinen Chloroformwiderstand verliert.

Die Versuchsergebnisse betonen die Rolle des Stoffwechsels der lebenden Epidermiszellen in der Ausbildung des Wasserretentionsvermögens. Anderseits betont das Beispiel von *Chenopodium album* die Wichtigkeit der Plasmastruktur: eine hydrophile Schicht auf der lipophilen Grenzmembrane des Ektoplasmas in den mit Wasser gesättigten Zellen voraussetzend.

LAJOS J. M. FELFÖLDY, Tihany, Biológia, Hungary.

CILIATEN DES SICH UNTER DEM MOOSRASEN AUF FELSEN GEBILDETEN HUMUS

J. GELLÉRT

BIOLOGISCHES FORSCHUNGSINSTITUT DER UNGARISCHEN AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN, TIHANY
(VORSTAND: B. ENTZ)

(Eingegangen am 31 Mai, 1955)

Zusammenfassung

In dem sich an den Felsen ansiedelnden urbodenbildenden Moosrasen lebt eine sehr reiche Mikrofauna. Von den Ciliaten wurden 37 Arten gefunden. Der Moosbiotop besteht aus dem sich unter ihm anhäufenden Detritus und Humus, was hingegen das Ergebnis der Zusammenwirkung des Mooses und der darin lebenden Mikroorganismen ist. Der Moosbiotop gewährleistet — im Gegensatz zu der Flechte — einen günstigeren Umgebungs-Wirkungskomplex. Seine Wasserkapazität ist grösser, die Schwankung der Insolations- und Temperaturverhältnisse mässiger, die Humusschicht dicker. Demzufolge ist der Moosbiotop reicher an Ciliatenfauna. Zwischen der Umwelt und den Mikroorganismen gestaltet sich ein Zusammenhang aus, der sich auch auf die Bodenbildung auswirkt. Die Stoffwechselprodukte häufen sich im Biotop an, die sich herausbildende Nahrungskette trägt zur Aufrechterhaltung des biologischen Gleichgewichts bei, die Detritusfresser spielen bei der Zersetzung des organischen Stoffes eine Rolle und schliesslich figurieren die zugrunde gegangenen Tiere als wichtige Humusbestandteile.

Die gefundenen Ciliaten passen sich den Umweltsverhältnissen am weitgehendsten an (Bewegung, Körpermass, allgemeiner Habitus, Ernährung).

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass der Moosrasen eine andere Fauna aufweist als die Flechte. Im Moos wurden 7 vereinzelt vorkommende Arten gefunden, die unter der in Nachbarschaft befindlichen Flechte in grosser Anzahl leben. Diese werden für bryoxene (das Moos besuchende) Arten gehalten. Als bryophile (das Moos begünstigende) Arten werden diejenigen betrachtet, die sowohl im Moos als auch in der Flechte, doch — zumindest einzelne — in anderen Biotopen ebenfalls in grosser Anzahl aktiv leben. Bryobiont (moosbewohnend) sind die 17 Arten, die hier beim Moosbiotop beschrieben oder von der Fachliteratur dafür gehalten werden. Die Aktivität und Individuenzahl der Moosbewohnenden ist höher als die der vorigen.

Aus dem Obigen folgt, dass der Moosrasen für die in Biozönose lebenden Mikroorganismen günstige Bedingungen gewährleistet und deren Zusammenwirkung bei der Urbodenbildung eine nützliche Rolle spielt.

Einleitung

In einer Arbeit [5] befasste sich der Autor der vorliegenden Abhandlung mit den Ciliaten der sich unter der felsenbewohnenden Flechte anhäufenden Humusschicht und mit deren Verhältnis zu der Umgebung. Er wies darauf hin, dass die sich auf den Felsen primär ansiedelnde Algenvegetation von den Flechten als nächste Sukzession abgelöst wird, sodann lagern sich Moose an, die Humusschicht benutzend, welche sich bereits unter der Flechte gebildet hat.

In dieser Arbeit werden die Ciliaten des felsenbewohnenden Moosrasens und ihre ökologischen Verhältnisse behandelt.

Das Untersuchungsmaterial wurde an der südwestlichen Seite des nordöstlich vom Dorf Boldogkőváralja liegenden Hügels Magoska gesammelt.

Die sich von der Oberfläche abhebenden Hypersthenaugitandesit-Felsenblöcke [1] werden stellenweise ausschliesslich von Flechte, anderswo von Flechte und Moosrasen, manche sogar vollkommen von Moosrasen bedeckt. Dieses Phänomen ist die Funktion der starken Insolation und der Veränderung der damit einhergehenden Feuchtigkeitsverhältnisse. An der Sammelstelle konnte die Ansiedlung der urbodenbildenden Flechten- und Moossukzessionen gut verfolgt werden. Die erwähnten Felsenblöcke kommen in einem Hochwald mit dichtem Unterholz zum Vorschein. An den Waldrändern, wo die Insolation stärker und der Feuchtigkeitsgehalt der Luft niedriger ist, sind die Felsen überwiegend von Flechten bedeckt. In der Tiefe des Waldes vermindert sich die Insolation, der Feuchtigkeitsgehalt der Luft ist höher, hier werden fast ausschliesslich Moosrasen angetroffen. Auf dem Gebiet zwischen diesen beiden Zonen, wo die Wirkung der erwähnten Umwältfaktoren in gleichem Masse zur Geltung kommen, verbreiten sich auch die Flechte und das Moos ebenso stark, mit der Zeit jedoch wächst der Moosrasen immer mehr über die Flechte und bedeckt sie zum Schluss ganz. Demzufolge geht die Flechte langsam zugrunde und wird zum Bestandteil des Humus. Während des Sammelns gelang es, von einzelnen Felsenblöcken auch 1 m^2 grosse Moosrasen abzutrennen, unter denen die Überreste des Flechtenniveaus zu erkennen waren. Abb. 1 und 2 zeigen die Verbreitungsverhältnisse zwischen der Flechte und dem Moos. Abb. 1 wurde von einem Gebiet aufgenommen, wo die Bedingungen der Umgebung die Entwicklung der Flechte förderten. Dies ist aus der starken Entfaltung des Flechtenlagers ersichtlich, während sich beim Moos Anzeichen der Austrocknung zeigen. Es ist jedoch zu erkennen, dass das Moos stellenweise über die Flechte zu wachsen beginnt. Abb. 2 hingegen veranschaulicht ein Gebiet, wo sich das Moos kräftiger entwickelt (der vorigen Aufnahme gegenüber ist das Moos frischer) und stufenweise die Flechte bedeckt.

Aus dem Obigen ist ersichtlich, doch auch sonst eine bekannte Tatsache, dass die Sukzession der beiden urbodenbildenden Schichten in Richtung Flechte-Moos erfolgt. Das Moos erhebt grössere »Ansprüche« bei seiner Entwicklung. Von den die Ansprüche befriedigenden Faktoren muss vor allem die dickere Humusschicht betont werden, die ihrerseits vom Flechtenniveau vorbereitet wurde. Damit steht auch die grössere Wasserkapazität im Zusammenhang. Sind die beiden Faktoren gegeben, so ist das Moos fähig, sich intensiv zu entwickeln, was wiederum eine grössere Humusanhäufung unter ihm mit sich bringt. Unter dem Moosrasen wurde stellenweise eine 2—3 cm dicke, aus Brocken, Sand und Detritus stammende Humusschicht gefunden. Diese Humusbildung kann mittelbar dem Moosrasen zugeschrieben werden. Bekannt ist auch die hochgradige Wasserkapazität des Moosrasens, die teils die Lösungswirkung des Wassers, teils die längerwährende Feuchtigkeit zu den Zersetzungsprozessen der organischen Stoffe gewährleistet.

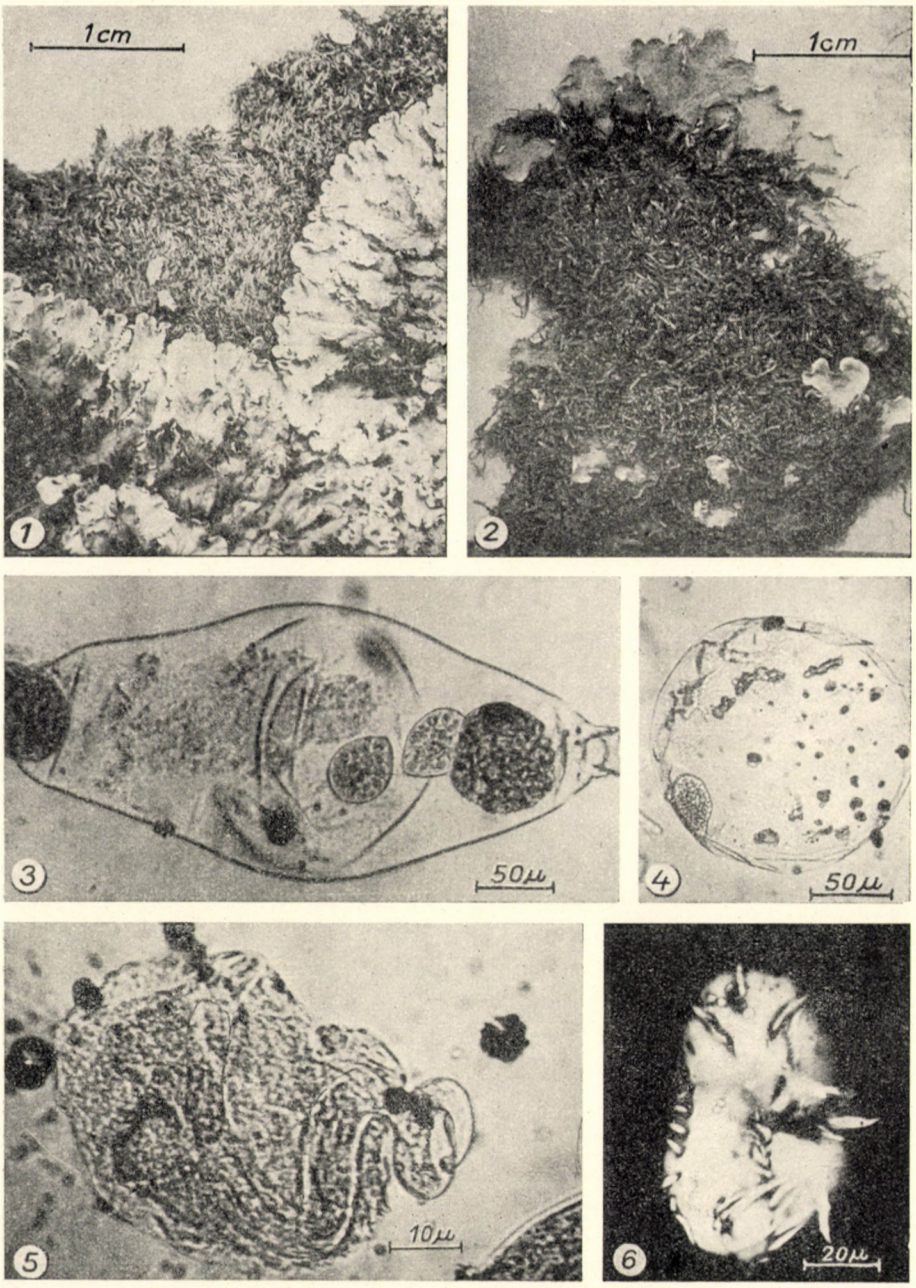


Abb. 1. Verbreitungsverhältnisse zwischen Flechte und Moos. Lichtbild. *2.* Verbreitungsverhältnisse zwischen Moos und Flechte. Lichtbild. *3. Paraglaucoma rostrata* in einem zugrunde gegangenen Rädertierchen. Mikrophoto. *4. Paraglaucoma rostrata* in einer zugrunde gegangenen Amöbe. Mikrophoto. *5.* Amöbe, eine Nematode sich einverleibend. Mikrophoto. *6. Gonostomum bryonicolum* n. sp. Ventralseite nach Opalblau-Präparat. Mikrophoto

Unter der Flechte bildet sich nur eine dünne Humusschicht und selbst in dieser kleinen Schicht leben zahlreiche Mikroorganismen. Allein von der Gruppe der Ciliaten konnten 32 Arten nachgewiesen werden. Es lohnt, auch die die zweite Schicht der Urbodenbilder gestaltenden Moosrasen vom Standpunkt der Ciliatenfauna aus zu untersuchen und mit der Flechte zu vergleichen. Besitzen sie eine gemeinsame Fauna, bzw. wie verändert sich die Fauna mit der Dicke der Humusschicht? Wie sind ihre ökologischen Verhältnisse?

Die Wasserkapazität der dünnen Humusschicht unter der Flechte ist sehr niedrig. Der Biotop ist den Veränderungen der Temperaturfaktoren stark ausgesetzt und demzufolge sehr extrem. Was gewährleistet dagegen der Moosrasen und die sich darunter anhäufende Humusschicht vom Standpunkt des Biotops aus? In vieler Hinsicht bietet auch der Moosrasen seinen Bewohnern besondere Verhältnisse. Trotz der hohen Wasserkapazität trocknet der Moosrasen mit der Zeit aus. Auch in diesem Fall handelt es sich also um einen kontinentalen Biotop, der bei feuchtem Wetter ausgesprochenen Wasserorganismen günstige Lebensbedingungen gewährleistet. Den Flechten gegenüber ist die Lage günstiger, weil der Moosrasen den Niederschlag gierig aufsaugt und eine längere Zeit hindurch aufbewahrt, seine Wasserkapazität somit grösser ist. Daraus folgt aber, dass sich der Vorgang der trotzdem eintretenden Austrocknung auf eine längere Zeit erstreckt und der Biotop eine längere Zeit hindurch über den für das Leben der Ciliaten notwendigen Wassergehalt verfügt. Der grössere Wassergehalt dämpft die infolge der Insolation entstehenden Temperaturschwankungen stark ; er erwärmt sich langsamer und kühlt sich langsamer ab.

Die Veränderung der chemischen Eigenschaften kann jedoch ihre Wirkung in grösserem Masse fühlen lassen und die Anpassungsfähigkeit der Ciliaten einer stärkeren Probe unterwerfen. Die chemischen Veränderungen stammen vor allem von der mit der grösseren Wasserkapazität einhergehenden, längere Zeit dauernden Lösungswirkung. Der Anstieg der Salzkonzentration wird aber durch die grössere Wasserschicht ausgeglichen. Eine bedeutende chemische Veränderung wird durch die Huminsäuren verursacht, die im Laufe des Humuswerdens der sich in der dickeren Schicht anhäufenden organischen Stoffe entstehen. Die Ciliaten passen sich dem an. Vom Standpunkt der Nahrungskette aus schaffen die unter dem Moosrasen stattfindenden Fäulnisprozesse den Flechten gegenüber eine günstigere Lage. Da der organische Stoff grösser ist, sind auch mehr Bakterien vorhanden, wogegen die Individuenzahl der Raubtiere anwächst, was schliesslich das Gleichgewicht wieder herstellt. Auch die Detritus-Fresser gelangen zu einer reicheren Nahrung.

Aus der Anführung der durch den Moosrasen gebotenen Umwältfaktoren ist ersichtlich, dass die Verschiebung dem Flechtenbiotop gegenüber in optimaler Richtung geschieht.

Bei den Untersuchungen waren folgende Hauptstandpunkte massgebend : 1. Welche Ciliaten leben im Biotop ; auf Grund des Vergleiches festzustellen,

ob die beiden Biotope eine speziale Fauna haben. 2. Die ökologischen Verhältnisse der Ciliaten des Biotops. 3. Schlussfolgerungen auf ihre Rolle bei der Urbodenbildung.

Als Untersuchungsmethode wurden dieselben Verfahren angewandt wie im Laufe der Forschungen bezüglich des Flechtenbiotops.

Beschreibung der Arten

1. *Holophrya saginata* PENARD. Länge 60 μ. Kleiner als die unter der Flechte lebenden Exemplare. Ernährt sich von Flagellaten.

2. *Spathidium spathula* O. F. MÜLLER. Länge 40—50 μ. Ist mit der Stammform identisch. Seine pulsierende Vakuole entleert je 17 Sek. Ernährt sich von kleinen Ciliaten.

3. *Spathidium scalpriforme* KAHL. Länge 90 μ. Kleiner als die Stammform. Seine pulsierende Vakuole entleert alle 35—40 Sek. Ernährt sich von winzigen Zooflagellaten.

4. *Spathidium alpinum* n. sp. (Abb. 7). Länge 110—120 μ. Langgestreckte Form im Verhältnis 5 : 1. Die Lippe bildet mit der Längsachse einen Winkel von 45°. Breite Lippe mit dichten kurzen Trichiten. Spaltenartige Mundöffnung. Auf jeder Seite 11 Zilienreihen mit dichten kurzen Zilien. 3 kurze Borstenreihen erstrecken sich bis zur Grenze der Halspartie. In der Körpermitte ein verdrehter langer Makronukleus mit vielen winzigen Mikronuklei. Terminale pulsierende Vakuole mit 6 Entleerungsöffnungen. Entleerungszeit 20—22 Sek. Plasma von heller, grüner Färbung. Körper biegsam. Langsame Bohrbewegung. Nahrung : kleine *Colpoden* und *Cyclidien*. Im Zusammenhang mit seiner Ernährung wurde folgende interessante Erscheinung wahrgenommen : Während seiner Bewegung stiess es an ein *Cyclidium*, das daraufhin, durch Trichiten gelähmt, gleich fixiert wurde und sich dann langsam zu einer locker zusammenhängenden, formlosen Plasmamasse verteilte. Zugleich bildete sich von der Mundöffnung des *Spathidium* ausgehend ein sich bis zur Länge des Halses erstreckender Schlundtrichter, dem folgend dehnte sich die Mundöffnung stark aus und schluckte die Plasmamasse — gleichsam eine Saugwirkung auf sie ausübend — langsam herunter. Bei diesem Vorgang muss man daran denken, dass dieses Tier mit seinen Trichiten nicht nur mechanisch, sondern durch gleichzeitige Einspritzung irgendeines Stoffes fixiert. Der Stoff übt eine die körperliche Intaktheit zersetzende Wirkung aus und so gelangt das Opfer in einer den Verdauungssäften leichter zugänglichen Form in die Nahrungsvakuole.

5. *Spathidium amphoriforme* var. *securiforme* KAHL, forma *B*. Länge 80 μ. Seine Nahrung besteht aus Ciliaten.

6. *Dileptus conspicuus* KAHL. Länge 110 μ. Von der etwas grösseren Stammform weicht er insofern ab, dass er terminal nur eine einzige pulsierende Vakuole hat, die alle 28 Sek. entleert. Nahrung : kleine Flagellaten.

7. *Dileptus americanus* KAHL. Länge 40 μ. Stimmt mit dem unter der Flechte lebenden überein, ist aber kleiner als die Stammform. Nahrung: Flagellaten.

8. *Colpoda cucullus* O. F. MÜLLER. Länge 60—80 μ. Ist etwas rundlicher als die Stammform. Die Mundorganellen sind entwickelter und liegen in einem geschlosseneren vestibularen Raum. Nahrung: Kugelalgen.

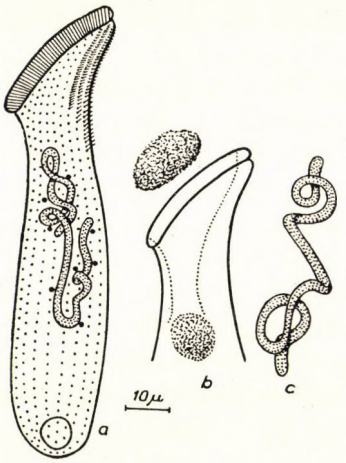


Abb. 7. Spathidium alpinum n. sp.: a) Nach Sublimatfixation und opalblaupräparat; b) Schlundtrichter im Augenblick des Schlukkens; c) Nukleusform

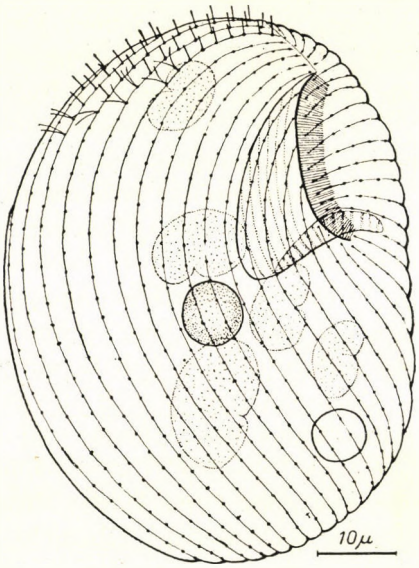


Abb. 8. Colpoda discoides n. sp. Nach Sublimatfixation und versilbertem Präparat

9. *Colpoda steini* MAUPAS. Länge 20—25 μ. Stimmt mit der Stammform und mit der unter der Flechte lebenden überein. Nahrung: Bakterien und Algen.

10. *Colpoda inflata* STOKES. Länge 40 μ. Ist mit dem Typus identisch. Nahrung: Kugelalgen.

11. *Colpoda discoidea* n. sp. (Abb. 8). Länge 60—70 μ. Sie hat in Seitenansicht eine diskoide, in Vorderansicht eine flache Form, die linke Seite ist konvex. Dichtes, paariges Wimperkleid, den oberen-hinteren Rand der rechten Seite ausgenommen, wo der Anfang von 5 Reihen aus steifstehenden einzelnen Zilien besteht. Die Zilienreihen verlaufen zwischen den Rippen. Mundorganellen von typischem *Colpoda*-Charakter. Die Mundöffnung bildet einen grossen vestibularen Raum. Hierher laufen von der linken Seite die Zilienreihen des Körpers, auf dem unteren Teil befindet sich das charakteristische untere Zilienfeld, ihm gegenüber das obere. In der Körpermitte runder Makronukleus. Es

gelang nicht, einen Mikronukleus zu beobachten. Auf der ventralen linken Seite alle 9 Sekunden entleerende pulsierende Vakuole. Bräunliche Farbe. Schnelle Bohrbewegung. Sehr selten. Ernährt sich von kleinen Ciliaten.

12. *Colpoda eurystoma* GELLÉRT [4]. Länge 60—70 μ. Stimmt mit der bei der Flechte beschriebenen Stammform überein, ist jedoch kleiner. Ihre Nahrung besteht aus kleinen Ciliaten.

13. *Woodruffia lichenicola* GELLÉRT [5]. Länge 60 μ. Stimmt mit der Stammform überein, ist jedoch kleiner. Nahrung: Algen und Pilzfäden.

14. *Trichopelma sphagnetorum* LEVANDER. Länge 35 μ. Weicht vom Typus insofern ab, als sich ihr Reusenapparat nicht nach vorne, sondern nach hinten erstreckt. Die pulsierende Vakuole entleert alle 19 Sek. Ernährt sich von grünen Kugelalgen.

15. *Drepanomonas revoluta* PENARD (Abb. 9 a—b). Länge 40 μ. Ihre Bestimmung war äusserst schwer. KAHL [6] veröffentlicht zwar eine moosbewohnende Form unter dem Namen *D. sphagni*, die Beschreibung ist aber unsicher. Unter den Bestimmungsmerkmalen der *D. sphagni* kommt auch das Fehlen des dorsalen Längsseptums vor. Bei den hier gefundenen Formen ist dieses vorhanden und deshalb werden sie als *D. revoluta* beschrieben, obwohl ihre Zilienverhältnisse auch davon abweichen. Im Hinblick darauf werden hier ihre kurze Beschreibung und eine vollkommenere Abbildung auf Grund der morphologischen Untersuchungen mitgeteilt. Bohnenähnliche, lateral flache, konstante Form. In der Mitte der Ventralseite keilförmige Mundöffnung mit einem rechtsseitigen Zilienfeld. Ventral zwei hintereinander liegende pulsierende Vakuolen. Dorsal in Mittellage ein runder Makronukleus mit einem Mikronukleus. In der Mitte der Dorsalseite ein in Längsrichtung verlaufendes Septum, das sich an den Enden verbreitert. Auf der Ventralseite supraoral 3 Rippen, die auf der rechten Seite beginnen und auf die linke Seite hinübergreifen. In der Tiefe der Rippen befinden sich auf der rechten Seite je 4, auf der linken je 1 bzw. in der oberen 2 Zilien. Zu Beginn der rechten Seite 4 wellenartige Vertiefungen mit 2—2—1—1 Zilien, am Hinterende 2 Vertiefungen mit je 1 Zilie. Ebenfalls auf der rechten Seite sind 2 unterbrochene Zilienreihen. Auf der linken Seite vorne dorsal befinden sich 4 Vertiefungen mit je 1 Zilie und neben jeder nach innen zu noch je 1 Zilie, am Hinterende dorsal 2 Vertiefungen mit je 1 Zilie, ventral hingegen 1 Vertiefung mit 2 Zilien. Ausserdem gibt es auf der linken Seite noch 7 Zilien. Statt der schweren und immer unvollkommenen Beschreibung werden die morphologischen Verhältnisse auf der Abbildung mitgeteilt. Ihre Nahrung besteht aus kleinen Flagellaten.

16. *Frontonia depressa* STOKES. Länge 60 μ. Stimmt mit der Stammform überein. Die pulsierende Vakuole entleert alle 24 Sek. Nahrung: Algen und Pilzsprosse.

17. *Paraglaucoma rostrata* KAHL. Länge 50—60 μ. Ist mit der Stammform identisch, mit dem Unterschied, dass die Lippe nicht so stark entwickelt

ist. Die pulsierende Vakuole entleert alle 9 Sek. Ernährt sich von Algen. Dabei schlüpft es mit Vorliebe in zugrunde gegangene Amöben, Rotatorien und Tardigraden und frisst den dort befindlichen organischen Stoff auf. Danach schlüpft es wieder aus der Pellikula, wo es sich zu enzystieren und zu teilen vermag. Abb. 4 zeigt ein in zerstörter Amöbe befindliches, Abb. 3 ein in einem Rädertierchen befindliches *Paraglaucoma*. Die Enzystierung und Ausschlüpfung erfolgt auf mechanischem Wege: es legt sich mit seinem spitzen Vorderende der

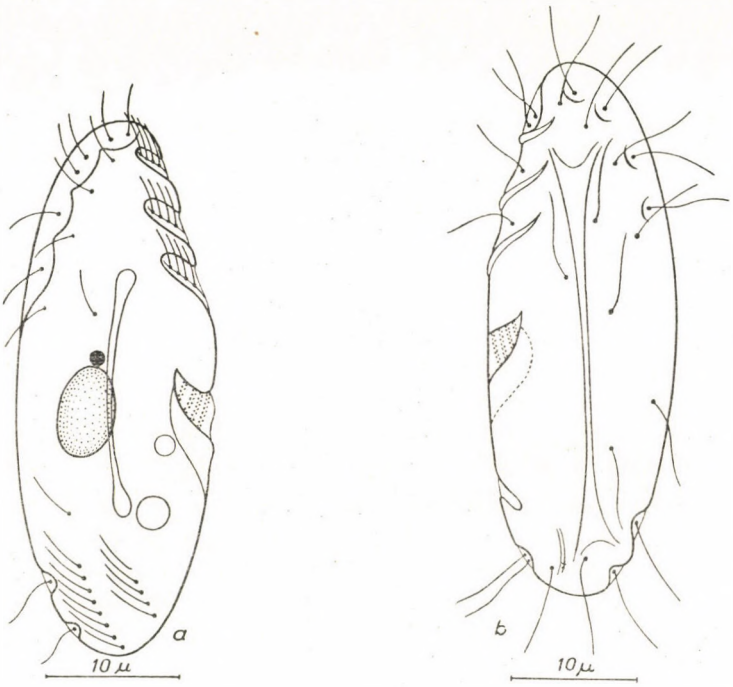


Abb. 9. Drepanomonas revoluta PENARD. Nach Sublimatfixation und Nigrosinpräparat: a) rechte und b) linke Seite

Pellikula bzw. Kutikula an, bohrt mittels einer Bohrbewegung in seine Längsachse eine Spalte und presst sich so durch.

18. *Cyclidium muscicola* KAHL. Länge 20 µ. Stimmt mit dem Typus überein. Nahrung: Bakterien.

19. *Bryometopus pseudochylodon* KAHL. Länge 65 µ. Ist mit dem Typus identisch. Nahrung: Bakterien.

20. *Blepharisma steini* KAHL. Länge 80 µ. Stimmt mit der Stammform überein. Die pulsierende Vakuole entleert alle 30 Sek. Nahrung: Bakterien.

21. *Phacodinium metschnikoffi* CERTES. Länge 70 µ. Ist kleiner als das unter der Flechte lebende. Nahrung: Bakterien und Detritus.

22. *Transitella lichenicola* GELLÉRT [3]. Länge 80 μ. Ist mit dem Typus identisch. Nahrung: Detritus.

23. *Thylacidium typicum* GELLÉRT [5]. Länge 80 μ. Ist kleiner als die bei der Flechte beschriebene Stammform. Ernährt sich von Bakterien.

24. *Paraholosticha muscicola* KAHL. Länge 90 μ. Weicht von der grösseren Stammform insofern ab, als in dem frontalen Raum der Zilienkranz nicht aus 20, sondern nur aus 4 Zirren, die Längsreihe der Zirren nur aus je 2 Zirren bestehen. Von den ventralen Reihen ist nur die rechtsseitige durchgehend, während die linksseitige an der Grenze des letzten Drittels endet. Die pulsierende Vakuole entleert alle 26—28 Sek. Ihre Nahrung besteht aus kleinen Flagellaten.

25. *Uroleptus humicola* n. sp. (Abb. 10). Länge 120 μ. Seine Morphologie entspricht den Arteneigenschaften des *Uroleptus*, die Anordnung der Zirren ist jedoch anders als bei den bisher bekannten Arten. Im Verhältnis 4 : 1 langgestreckte, sich am Hinterende verjüngende zylindrische Form. Die rechtsseitige marginale Zirrenreihe verläuft dem Rand entlang, während die linksseitige am unteren Ende der Lippe beginnt und von hier zum Rand verläuft. Die marginalen Reihen schliessen sich hinten nicht ab. Am Anfang des frontalen Raums 3 kräftigere Zirren. 3 ventrale Reihen, von denen die rechtsseitige bis zum Ende, die folgende nur bis zur Grenze des letzten Drittels verläuft, während die dritte neben der Lippe lediglich aus 9 Zirren besteht. Am oberen Ende der Lippe ein einzelner Zirrus. Die Strudelorganelle erstreckt sich bis zur Grenze des ersten Körperviertels, reicht bis zur Längsachse und besteht aus 31 Membranellen. Am Rand der gewölbten Lippe aus langen Zilien bestehende adorale Membran, darunter eine kurze endorale Membran, diesen gegenüber, neben der Strudelorganelle, eine aus sehr langen Zilien bestehende parorale Zilienreihe. Auf der linken Seite in der Mitte mit Sammelkanal versehene, alle 13—17 Sek. entleerende pulsierende Vakuole. Der Nukleus ist in etwa 32 Stücke verteilt. Seine Nahrung besteht aus Detritus.

26. *Holosticha manca* KAHL var. *plurinucleata* GELLÉRT [5]. Länge 60 μ. Unterscheidet sich nur insofern von der bei der Flechte beschriebenen Varietät, als sie sich nicht von Algen, sondern von Bakterien und Detritus ernährt.

27. *Holosticha kessleri* WRZESNIOWSKI. Länge 110 μ. Unterscheidet sich von dem Typus, indem ihre ventralen Reihen nicht durchlaufen. Die rechtsseitige Reihe zieht sich bis zur Grenze des letzten Viertels, die linksseitige bis zur Körpermitte. Neben der Lippe befindet sich eine nicht aus 4, sondern aus 10 Zirren bestehende Reihe. Die Anzahl der transversalen Zirren ist nicht 12, sondern nur 11. Darüber 2 Zirren, die bei der Stammform nicht vorhanden sind. Die pulsierende Vakuole entleert alle 17 Sek. Ihre Nahrung besteht überwiegend aus beschalten Amöben.

28. *Holosticha muscicola* n. sp. (Abb. 11). Länge 110 μ. Laut des KAHLschen Bestimmungsbuches [6] könnte sie auch ein *Keronopsis* sein, doch im Hinblick

darauf, dass sich im frontalen Raum 3 kräftige Zirren sehr scharf absondern, musste sie als *Holosticha* eingereiht werden. Hinter den 3 frontalen Zirren stehen je 2 Zirren. Die marginalen Zirren schliessen sich hinten nicht ab. Bis zur Mittellinie des Körpers eng nebeneinander verlaufende ventrale Reihen. 6 über den Körper hinausgehende transversale Zirren. Über den transversalen ein einzelner Zirrus. Die Strudelorganelle reicht bis zur Grenze des ersten Körperviertels und besteht aus 32 Membranellen. Lippe gewölbt. An deren Rand

Abb. 10. Uroleptus humicola n. sp. Ventralseite nach Sublimatfixation und Opalblaupräparat

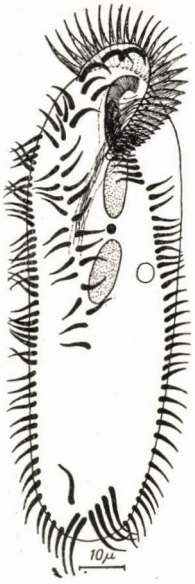


Abb. 11. Holosticha muscicola n. sp. Ventralseite nach Sublimatfixation und Opalblaupräparat

aus langen Zilien bestehende adorale Membran, darunter ebenfalls aus langen Zilien bestehende endorale Membran. Der Lippe gegenüber, neben der Strudelorganelle gehen lange Fadengebilde aus, die in den Rachen hineinreichen und mit ihrer Undulierung die Nahrung gleichsam lenken. Neben der endoralen Membran 4 alleinstehende parorale Zilien. 2 ovale Makronuklei, zwischen ihnen ein einziger Mikronukleus. Pulsierende Vakuole auf der linken Seite in der Mitte, Entleerungszeit 35—40 Sek. Nahrung: Bakterien und Detritus.

29. *Amphisiella terricola* GELLÉRT [5,8]. Länge 110—120 μ. Etwas grösser als der bei der Flechte beschriebene Typus. Entleerungszeit 22—25 Sek. Nahrung: kleine Ciliaten.

30. *Gonostomum spirotrichoides* n. sp. (Abb. 12). Länge 110 μ. Zylindrischer Körper. Auf der rechten Seite der Ventralseite befinden sich 19, auf der linken Seite 15 marginale Zirren. Am Hinterende 4 kaudale Zirren. Im frontalen Raum 3 Zirren, dahinter eine aus 3 Zirren bestehende, von rechts nach links verlaufende schräge Reihe. An deren Ende auf der linken Seite je 1 einzelner Zirrus. An der Grenze des ersten Körperdrittels, der Längsachse entlang, noch 2 alleinstehende Zirren. Über den Körper hinausreichende 4 transversale, davor

Abb. 12. Gonostomum spirotrichoides n. sp. Ventralseite nach Sublimatfixation und Nigrosinpräparat

Abb. 13. Gonostomum bryonicolum n. sp. Ventralseite nach Sublimatfixation und Opalblaupräparat

2 ventrale Zirren. Auf der Dorsalseite 3 Tastborstenreihen mit langen Borsten. Die Strudelorganelle reicht bis zum Schnittpunkt der Längs- und Querachsen hinein. Während beim allgemeinen Hypotrichustyp die Strudelorganelle offen verläuft, ist hier die ganze Strudelorganelle schon vom Ausgangspunkt in der Mundöffnung bedeckt (Einzelheiten siehe auf der Abbildung). Die Strudelorganelle besteht aus 27 Membranellen. Von diesen sind die am Vorderende befindlichen 4 Membranellen länger als die nachfolgenden (*Spirotricha*-Charakter, s. *Parablepharismen*). Vom allgemeinen Hypotrichus-Charakter abweichend, verfügt das Tier über keine peristomale Lippe, an deren Stelle sich eine auf

der Körperoberfläche verlaufende Reihe aus 22—25 üblichen Zilien befindet. Die Mundöffnung ist ein in der Körpermitte von vorne nach hinter laufender trichterförmiger Raum, der von der Ventralseite aus offen ist und sich in einem fast querlaufenden kurzen Rachen fortsetzt. Die Form der Mundöffnung, der Ablauf der Strudelorganelle, das Fehlen der Lippe sowie die an der Stelle der Lippe befindliche Zilienreihe erschöpft in grossem Masse den *Spirotricha*-Charakter. 2 ovale Makronuklei mit je 1 Mikronukleus. Die pulsierende Vakuole ist in der Körpermitte auf der linken Seite und entleert alle 19—21 Sek. Das Plasma ist hell, von grüner Färbung, darin eine grosse Menge Ersatznährstoffkörner. Das Tier ernährt sich von Bakterien und Detritus.

31. *Gonostomum bryonicolum* n. sp. (Abb. 6 und 13). Länge 60 μ. Ovale, zylindrische Körperform. Auf der Ventralseite verlaufen die marginalen Zirren dem Rand entlang, hinten schliessen 4 terminale kaudale Zirren die Reihe ab. Im frontalen Raum befinden sich vorne 3 kräftige Zirren, dahinter eine schräge Reihe aus 5 Zirren. Daneben sowie am oberen Ende der Lippe je 1 einzelner Zirrus. 4 transversale Zirren, vor diesen 1 ventraler Zirrus reichen über den Körper hinaus. Auf der Dorsalseite 4 vollständige Borstenreihen mit langen Borsten. Die Strudelorganelle, die aus 26 doppelten Membranellen besteht, reicht bis zur Linie der Querachse hinein. Die Mundorganellen weichen von denen des Hypotrichustyps ab. Beim allgemeinen Typ liegen nämlich die Membranellen zu zwei Drittel bzw. drei Viertel auf der Ventralseite, hier hingegen liegt nur ein Viertel auf der Ventralseite, während die übrigen Teile auf die linke Seite des zylindrischen Körpers verlaufen und sich dort bis zum Vorderende des Körpers ziehen. Auch die Lippe ist verschieden, da sie einen weiten vestibularen Raum bildet und sich dieser in einem kurzen Rachen fortsetzt. Auf der Lippe findet man keine für die Hypotrichen charakteristischen Membranellen, sondern statt dessen 16 einzelne Zilien am Lippenrand. Betrachtet man die Mundorganellen in ihrer Gesamtheit, so muss festgestellt werden, dass sie in grossem Masse der Mundstruktur der Spirostomiden entsprechen. 2 ovale Makronuklei mit je 1 Mikronukleus. Die pulsierende Vakuole konnte nicht beobachtet werden. Plasma hell, von grünlicher Färbung. Nahrung : Detritus.

32. *Gonostomum ciliophorum* n. sp. (Abb. 14). Länge 70 μ. Schmale, konstante Form. Die marginalen Zirren verlaufen am Rand und schliessen sich hinten. Im frontalen Raum vorne 3 kräftige Zirren, dahinter eine sich von rechts nach links biegende, aus 3 Zirren bestehende Reihe (*Gonostomum*-Charakter). In der Mitte des frontalen Raumes kurze Reihe aus je 2 Zirren. 4 transversale, davor 2 ventrale Zirren. Von den 4 transversalen sind die 2 linksseitigen kurz, während die 2 rechtsseitigen länger sind und schräg über den Körper hinausreichen. Die Strudelorganelle besteht aus 30—32 Membranellen und reicht bis zur Linie der Querachse. Ähnlich dem *G. bryonicolum* läuft die Strudelorganelle zum Körperrand und kaum ein Viertel befindet sich auf der Ventralseite. Auf der Ventralseite von links bedeckt die aus dem frontalen Raum

hinausreichende Plasmamembran die Strudelorganelle, die sich nach hinten zu unter die Lippe zieht. Am Ende der Strudelorganelle kurzer Schlundtrichter. Lippe gerade, am unteren Ende ihres Randes kurze undulierende Membran, die sich nach oben zu bis zum Ende der Lippe in alleinstehenden Zilien fortsetzt. Die Form der Mundorganellen erinnert an den Spirostomidenzustand. 2 ovale Makronuklei mit je 1 Mikronukleus. In Höhe der Mundöffnung auf der

Abb. 14. Gonostomum ciliophorum n. sp. Ventralseite nach Sublimatfixation und Opalblaupräparat

Abb. 15. Steinia dubia n. sp. Ventralseite nach Sublimatfixation und Opalblaupräparat

linken Seite alle 6—7 Sek. entleerende pulsierende Vakuole. Plasma hell, durchscheinend. Nahrung: Detritus und Bakterien.

33. *Oxytricha proximata* SHIBUYA. Länge 60 μ. Weicht von der Stammform nur insofern ab, dass sich die Randzirren hinten nicht schliessen. Auf der Dorsalseite 5 vollständige und 2 unvollständige Borstenreihen. Ebenfalls auf der Dorsalseite in der Mitte linsenförmige Unterspalte. Nahrung: Detritus.

34. *Steinia tetracirrata* GELLÉRT[2]. Länge 90 μ. Vom Typus weicht sie nur insofern ab, als die transversalen Zirren nicht glatt, sondern kammartig sind. Die pulsierende Vakuole entleert alle 8 Sek. Ernährt sich von Ciliaten.

35. *Steinia dubia* n. sp. (Abb. 15). Länge 140—150 μ. Leicht sigmoide Form. Im frontalen Raum befinden sich die für das *Oxytricha*-Genus charakteristischen 3—3—2 Zirren. Ventral 2—1—2 Zirren. Die marginalen Reihen schliessen sich hinten nicht. Die letzten marginalen Zirren sind länger (*Tachy-*

soma-Charakter). 5 transversale Zirren reichen über den Körper hinaus. Die Strudelorganelle besteht aus 31 Membranellen. Lippe spiral gekrümmt. Auf der Lippe die üblichen adoralen und endoralen Membranen. Bis zur Mittellinie des Körpers hineinreichender Schlundtrichter. Im mittleren Körperdrittel 2 Makronuklei, in ihrem Innern mit einem kreisförmigen, durchscheinenden Gebiet, neben ihnen je 1 Mikronukleus. Auf der linken Seite in der Mitte pulsierende Vakuole, die alle 11 Sek. entleert. Plasma blassrosa. Ihre Bewegung ist langsam, kriecht in der Regel mit mehreren zwischen den Klumpen. Nahrung: Algen und Pilzsprosse. Eine sehr schwer bestimmbare Form, da alle Teile für ein anderes Subgenus charakteristisch sind. Die Krümmung der Lippe ist ein *Steinia*-Merkmal, die marginalen Zirren sind nicht geschlossen und die Randzirren hinten länger, was hingegen ein *Tachysoma*-Merkmal ist. Auf Grund der charakteristischen Strudelorganelle und Lippe wird sie trotzdem als *Steinia* eingereiht.

36. *Stylonichia muscorum* KAHL. Länge 80—90 μ. Stimmt mit der von KAHL beschriebenen Form überein, obwohl weder diese noch die von KAHL den *Stylonichia*-Charakter erschöpfen. Die pulsierende Vakuole entleert alle 16 Sek. Nahrung: Algen und Flagellaten.

37. *Euplotes muscicola* KAHL. Länge 40—50 μ. Ist mit dem Typus identisch. Nahrung: Algen.

Ökologie der gefundenen Arten

In Kenntnis der Ciliatenfauna der beobachteten Moose wollen wir untersuchen, inwiefern sie mit den Ciliaten des Flechtenbiotops übereinstimmt bzw. von denen abweicht.

In bezug auf den Flechtenbiotop wurde die Frage gestellt, welche von den flechtenbewohnenden Ciliaten lichenobionte, welche lichenophile und schliesslich welche lichenoxene sind. Dank des damaligen Standes der auf den Moosbiotop bezüglichen Untersuchungen sah man die Entfaltung einer gemeinsamen Ciliatenfauna. In Kenntnis der Ciliaten des Moosrasens musste diese Frage einer Revision unterzogen werden. Bei der Flechte wurden 32, beim Moos 37 Ciliatenarten gefunden, von denen sich die Artenidentität lediglich auf 17 bezieht (Tabelle 1). Beim Moos wurden also 20 Ciliaten angetroffen, die unter der Flechte nicht leben. Von den in beiden Biotopen vorkommenden 17 Arten konnten beim Moos 7 Arten nachgewiesen werden, die entweder in verschwindend kleiner Anzahl (*Holophrya saginata*, *Spathidium amphoriforme*, *Dileptus americanus*, *Colpoda eurystoma*, *Phacodinium metchnikoffi*) oder nur mit einigen Individuen (*Transitella lichenicola*, *Thylacidium typicum*) vertreten waren. Diese in geringer Anzahl vorkommenden 7 Arten leben dagegen unter der Flechte in einer grossen Individuenzahl.

Auf Grund dessen gelangt man zu der Überzeugung, dass sowohl die Flechte als das Moos eine besondere Ciliatenfauna aufweisen, was durch folgendes unterstützt werden kann: um die Bewohner beider Biotope vergleichen zu können, wurde auch von solchen Felsenblöcken Material gesammelt, wo sich die Flechte wie auch das Moos ansiedelten und dadurch die beiden Biotope in Berührung kamen. Man würde annehmen, dass unter solchen Umständen eine identische Fauna vorgefunden wird, doch zeigten die Untersuchungen dieselben bereits besprochenen Artenunterschiede.

Es wäre interessant festzustellen, welche von den 37 Ciliatenarten Moose besuchende (bryoxene), welche Moose begünstigende (bryophile) und schliesslich welche moosbewohnende (bryobionte) Arten sind. Bei Entscheidung der Frage wurden Identität und Verschiedenheit der Bewohner des Flechten- und des Moosbiotops, die Individuenzahl der einzelnen Arten, die Häufigkeit und Aktivität der Arten sowie die Hinweise laut des KAHLschen Bestimmungsbuches berücksichtigt.

Tabelle 1

I. Unter der Flechte lebende Ciliaten

Benennung der Arten	Nahrung	Masse in μ
Holophrya saginata	Flagellaten	80
Spathidium spathuloides	Ciliaten	35
Spathidium multinucleatum	Ciliaten	80
Spathidium amphoriforme var. *securiforme*, forma *B*	Ciliaten	90—100
Spathidium muscicola	Ciliaten	80
Bryophyllum loxophylliforme	Pilze und Algen	130
Dileptus conspicuus var. *telobivacuolatus*	Ciliaten	120
Dileptus americanus	Flagellaten	60
Colpoda cucullus	Algen	40—70
Colpoda steini	Pilze und Algen	20—25
Colpoda inflata	Algen	40
Colpoda colpidiopsis	Bakterien	40
Colpoda quinquecirrata	Pilze und Algen	50
Colpoda eurystoma	Ciliaten	60—100
Bresslaua discoidea	Ciliaten	150—180
Woodruffia lichenicola	Pilze und Algen	70
Woodruffia sinistromembranellata	Pilze und Algen	60—80
Mycterothrix acuminata	Bakterien	20—25
Trichopelma stenostomata	Flagellaten	20—30
Frontonia depressa	Algen	60—70
Cyclidium muscicola	Bakterien	15—20
Bryometopus pseudochilodon	Bakterien	60
Phacodinium metchnikoffi	Bakterien und Detritus	80—100
Transitella lichenicola	Detritus	70—90
Thylacidium typicum	Bakterien	110—120
Paraholosticha lichenicola	Algen und Detritus	100
Paraholosticha nana	Algen und Detritus	60—70
Keronopsis alpestris	Algen und Detritus	70—80
Keronopsis muscorum	Pilze und Algen	120
Holosticha manca var. *mononucleata*	Pilze und Flagellaten	60
Holosticha manca var. *plurinucleata*	Pilze	80
Amphisiella terricola	Ciliaten	100

II. Unter dem Moos lebende Ciliaten

Benennung der Arten	Nahrung	Masse in μ	Entleerungszeit der pulsierenden Vakuolen in Sek.	Vorkommen der Arten
Holophrya saginata	Flagellaten	60	—	Flechte, Moos
Spathidium spathula	Ciliaten	40—50	17	Moos, Süsswasser
Spathidium scalpriforme	Flagellaten	90	35—40	Moos
Spathidium alpinum	Ciliaten	110—120	20—22	Moos
Spathidium amphoriforme var. *securiforme*, forma *B*	Ciliaten	80	—	Flechte, Moos
Dileptus conspicuus	Flagellaten	110	28	Flechte, Moos
Dileptus americanus	Flagellaten	40	—	Flechte, Moos
Colpoda cucullus	Algen	60—80	—	Flechte, Moos
Colpoda steini	Algen und Bakterien	20—25	—	Flechte, Moos
Colpoda inflata	Algen	40	—	Flechte, Moos
Colpoda discoidea	Ciliaten	60—70	9	Moos
Colpoda eurystoma	Ciliaten	60—70	—	Flechte, Moos
Woodruffia lichenicola	Algen und Pilze	60	—	Flechte, Moos
Trichopelma sphagnetorum	Algen	35	19	Moos
Drepanomonas revoluta	Flagellaten	40	—	Moos
Frontonia depressa	Algen und Pilze	60	24	Flechte, Moos
Paraglaucoma rostrata	Algen	50—60	9	Moos
Cyclidium muscicola	Bakterien	20	—	Flechte, Moos
Bryometopus pseudochilodon	Bakterien	60	—	Flechte, Moos
Phacodinium metchnikoffi	Bakterien und Detritus	70	—	Flechte, Moos
Blepharisma steini	Bakterien	80	30	Moos
Transitella lichenicola	Detritus	80	—	Flechte, Moos
Thylacidium typicum	Bakterien	80	—	Flechte, Moos
Paraholosticha muscicola	Flagellaten	90	26—28	Moos
Uroleptus humicola	Detritus	120	13—17	Moos
Holosticha manca var. *plurinucleata*	Bakterien und Detritus	60	—	Flechte, Moos
Holosticha kessleri	Thekamöben	110	17	Moos, Süsswasser
Holosticha muscicola	Bakterien und Detritus	110	35—40	Moos
Amphisiella terricola	Ciliaten	110—120	22—25	Flechte, Moos
Gonostomum spirotrichoides	Bakterien und Detritus	110	19—21	Moos
Gonostomum bryonicolum	Detritus	60	—	Moos
Gonostomum ciliophorum	Bakterien und Detritus	70	6—7	Moos
Oxytricha proximata	Detritus	60	—	Moos, Boden
Steinia tetracirrata	Ciliaten	90	8	Moos, Baumrinde
Steinia dubia	Algen und Pilze	140—150	11	Moos
Stylonichia muscorum	Flagellaten und Algen	80—90	16	Moos
Euplotes muscicola	Algen	40—50	—	Moos

Als bryoxen müssen die 7 Arten eingereiht werden, die in kleiner Anzahl oder eben nur mit 1—2 Individuen im Moosbiotop vertreten sind, obwohl sie

unter der Flechte in grosser Anzahl und aktiv leben. Von diesen kamen einzelne nicht einmal in jeder Probe vor *(Thylacidium, Transitella, Phacodinium)*.

Unter die bryophilen Arten werden diejenigen eingeteilt, die — obschon sie unter dem Moos günstige Bedingungen finden — trotzdem nicht denselben Individuenreichtum und die Aktivität zeigen wie die moosbewohnenden. Hierher sind folgende einzureihen : *Colpoda cucullus, Colpoda steini, Colpoda inflata, Colpoda discoidea, Woodruffia lichenicola, Frontonia depressa, Cyclidium muscicola, Bryometopus pseudochilodon, Holosticha manca* var. *plurinucleata, Holosticha kessleri, Amphisiella terricola, Oxytricha proximata, Steinia tetracirrata.* Davon, dass diese Arten bryophil sind, zeugt auch der Umstand, dass sie in anderen Biotopen ebenfalls leben ; so gibt es unter ihnen manche, die auch unter Flechten immer anzutreffen sind (Tabelle 1), während andere überall vorkommen, wo Boden zu finden ist. Zu den letzteren gehören im allgemeinen die *Colpoden* und die *Oxytricha proximata.*

Für moosbewohnende, bryobionte, werden die 17 Arten gehalten, die teils von der Fachliteratur hier eingereiht, teils als neue Arten unter dem Moos nun beschrieben werden, doch spricht auch die Beobachtung des Verfassers dafür, dass bei einigen die Individuenzahl zwar kleiner, aber die Aktivität um so grösser ist. Die niedrigere Individuenzahl einzelner moosbewohnender Arten ist damit zu erklären, dass sie von den Raubtieren beschränkt wird *(Cyclidium, Trichopelma, Drepanomonas)*. Von den in der grössten Aktivität lebenden und die höchste Individuenzahl aufweisenden Bryobionten müssen folgende Arten hervorgehoben werden : *Spathidium scalpriforme, Trichopelma sphagnetorum, Drepanomonas revoluta, Paraglaucoma rostrata, Blepharisma steini, Uroleptus humicola, Gonostomum spirotrichoides, Gonostomum bryonicolum, Gonostomum ciliophorum, Stylonichia muscorum.*

Um die Zusammensetzung der moosbewohnenden Ciliatenfauna zu bestimmen, wurden aus fernerliegenden Teilen des Sammelgebietes stammende Moosrasen untersucht, aber auch aus derselben Stelle stammende des öfteren überprüft. In bezug auf die Häufigkeit und Aktivität der Arten wurden im Laufe der wiederholten Untersuchungen identische Werte festgestellt. Zur obigen Einteilung lieferten diese allgemeingültigen Beobachtungen die sicherste Grundlage.

Durch den Vergleich der Körpermasse der Ciliaten des Flechten- und Moosbiotops erhalten wir ebenfalls einen Anhaltspunkt zur Trennung der bryoxenen Arten. Werden die für bryoxen gehaltenen 7 Arten mit den im Flechtenbiotop lebenden Exemplaren verglichen, so kann festgestellt werden, dass ihre Länge ohne Ausnahme zum mindesten um 20 μ, doch in einzelnen Fällen *(Thylacidium typicum)* sogar um 30—40 μ kleiner ist. Demgegenüber weisen die bryophilen Arten, die in beiden Biotopen leben, im allgemeinen unveränderte Körpermasse auf oder sind in einzelnen Fällen *(Bryometopus pseudochilodon, Colpoda cucullus)* höchstens um 5—10 μ grösser.

Allgemeine ökologische Verhältnisse

Im Gegensatz zu den 32 Arten unter der Flechte, leben unter dem Moos 37 Arten. Ähnlich der Flechte bewohnen auch Amöben, Flagellaten, Rotatorien, Nematoden und Tardigraden in grosser Anzahl den Moosrasen, und so kommt den mit den Ciliaten in Biozönose lebenden Mikroorganismen bei der sich ausgestaltenden Nahrungskette sowie der Bodenbildung ebenfalls eine mittelbare Rolle zu.

Im Zeichen der Einheit des Lebewesens und seiner Umgebung sollen auch die ökologischen Verhältnisse betrachtet werden. Hier muss man die Einkapselung und Ausschlupf, die Körpermasse und den allgemeinen Habitus, die Bewegung im Biotop, die Auftrittsfolge und damit im Zusammenhang die Herausbildung der Nahrungskette sowie die Wassermenge beachten.

Die ökologischen Verhältnisse stimmen im allgemeinen damit überein, was in Verbindung mit der Mikrofauna unter der Flechte bereits festgestellt worden ist. Einige Standpunkte müssen jedoch hervorgehoben werden.

Der Ausschlupf erfolgt im allgemeinen binnen 15 Minuten. Die Einkapselung dagegen erstreckt sich auf eine längere Zeit, was mit dem längeren Feuchtigkeitszustand des Biotops zu erklären ist. Während die Vermehrung im Flechtenbiotop eben infolge der kurzen Feuchtigkeitsperiode überwiegend im Zystenzustand vor sich geht, teilen sich die Tiere im Moosbiotop auch in der aktiven Periode intensiv.

Bezüglich der Körpermasse wurden im grossen und ganzen dieselben Verhältnisse gefunden wie bei der Flechte. In dieser Hinsicht verteilten sich die 37 Arten folgendermassen: unter 50 μ 8 Arten, zwischen 50 und 100 μ 21 und über 100 μ wiederum 8 Arten (bei der Flechte 9—18—5). Hier dominieren also ebenfalls die kleineren Tiere.

Mehr verrät jedoch die Massverteilung sämtlicher, in einer gewissen Wassermenge lebender Individuen. In 1 ml aus der Mooskultur herauspipettierter Wassermenge (mehrfache Probe!) wurden 1384—1490 Individuen abgezählt, von denen lediglich 212 über 40—50 μ lang waren. Dieses Verhältnis erfuhr während des aktiven Zustands Verschiebungen. Am Anfang der mit der Feuchtigkeit zusammenhängenden aktiven Periode ist die Zahl der kleinen Ciliaten grösser, während sie später, entsprechend der Vermehrung der Raubtiere, abnimmt. Im allgemeinen traten 12—14 Stunden nach Befeuchtung des trockenen Stoffes sämtliche Arten auf, erreichten aber nur nach 60—80 Stunden die obige Individuenzahl.

Vom Gesichtspunkt des allgemeinen Habitus aus ist festzustellen, dass die kleineren Tiere eine konstante Form aufweisen, während sich die grösseren dank ihrer Biegsamkeit und keilähnlicher schmaler Form im Biotop fortzubewegen vermögen. Der grössere Teil der Arten bewegt sich im Verhältnis zu dem kleinen Wasserraum sehr langsam. Meistens kriechen sie nur zwischen den

Klumpen herum und schwimmen nur wenig. Die Beobachtung bezieht sich vor allem auf die aus dem Moospolster herauspipettierten und in Embryumschale untersuchten Umstände, doch ist in situ dasselbe festzustellen. Es ist nämlich bekannt, dass sich bei Sättigung mit Wasser eine grosse Wassermenge im Teil über dem Humus, zwischen den Moosblättchen, befindet. In diesem freien Wasser kommen Ciliaten kaum vor, was davon zeugt, dass sie zwischen den Klumpen günstigere Lebensbedingungen finden. WENZEL vertritt eine gegensätzliche Auffassung [9]. Nach ihm bewohnen die Ciliaten die sich an das Moospolster schmiegende Bodenschicht kaum, und die sich dort aufhalten, gelangten auch aus dem Moos dorthin. In der tiefer (1—2 cm) liegenden Bodenschicht kämen praktisch gar keine moosbewohnenden Ciliaten vor. Im Sinne des Obigen betrachtet WENZEL die an das Moospolster haftende Bodenschicht als nicht zum Biotop gehörig. Ihm gemäss bildet die an der unteren Fläche des Moospolsters befindliche, aus lebenden und abgestorbenen Moosteilen bestehende, Wasser speichernde Schicht von spongiöser Struktur den Kern des Biotops. Die letzte Feststellung ist richtig, doch kann man mit dem Ausserachtlassen der dem Moos anliegenden Bodenschicht vom Standpunkt des Biotops nicht einverstanden sein. Nach Ansicht des Verfassers dieser Arbeit ist die Genese der Bodenschicht eng an das Moos, an dessen Ansiedlung gebunden. An der Sammelstelle zeigte die Erfahrung — ohne Ausnahmen —, dass wenn man das Moospolster von dem Felsen abreisst, sich zusammen damit auch eine 1—2 cm dicke Bodenschicht loslöst, also eng dazu gehört. Wenn nun vom Moosbiotop gesprochen wird, ist auch die damit aufreissende Bodenschicht mit einbegriffen.

Die Feststellung von WENZEL, dass in der von abgestorbenen Moosteilen durchwobenen Bodenschicht kaum Ciliaten leben, kann ebenfalls nicht bestätigt werden. Weiter oben wurde in dieser Arbeit genau das Gegenteil behauptet. Die von lebenden und abgestorbenen Moosteilen durchwobene, sich im Gewebe anhäufende und dadurch zusammengehaltene Bodenschicht bildet den Kern des Biotops. Nicht aus dem eigentlichen Moospolster gelangen die Ciliaten in die Bodenschicht, sondern eben umgekehrt, sie schwimmen gelegentlich aus der Bodenschicht zwischen die Moospflanzen. Dies wird auch durch die Beobachtung gestützt, dass in dem zwischen den Moosblättchen herauspipettierten Wasser Ciliaten nur vereinzelt vorkommen. Die Ernährungsverhältnisse beweisen dasselbe. Ein Teil der den Biotop bevölkernden Ciliaten ernährt sich von Bakterien, Algen und Detritus, während der andere Teil eine reissende Lebensweise führt. Für die ersteren befindet sich Nahrung in der unter dem Moospolster durch das Gewebe der abgestorbenen Teile zusammengehaltenen Schicht in reichlicher Menge, sie können sich also hier vermehren und dieser Umstand zwingt auch die Raubtiere, sich an dieser Stelle aufzuhalten.

Der zwischen den Moosblättchen zurückgehaltene Niederschlag verdampft zum Teil, zum Teil wird er von der sich unter dem Moospolster gebildeten Bodenschicht eingesaugt, was die Ciliaten in die Bodenschicht zwingt. Auch

die ökologischen Verhältnisse sprechen also dafür, dass die an organischen Stoffen reiche Bodenschicht den Kern des Biotops bildet und sich die Hauptmasse der Ciliatenfauna hierher beschränkt.

Die Auftrittsfolge der Arten steht mit den Nahrungsverhältnissen im Zusammenhang. Die Bevölkerung des Biotops kann nicht mit den Raubtieren beginnen. 15 Minuten nach Aufgiessen des trockenen Stoffes erscheinen bereits die ersten Ciliaten, die alle zu bakterien-, algen- und detritusfressenden Arten gehören. Solche sind vor allem: *Colpoda steini*, *Colpoda inflata*, *Trichopelma sphagnetorum*, *Cyclidium muscicola*, *Bryometopus pseudochilodon*, *Oxytricha proximata* und *Gonostomum bryonicolum*. Sie sind zugleich die kleinsten Tiere. Die Auftrittsfolge der übrigen Arten ist schon schwer festzustellen, doch ist es sicher, dass die Raubtiere nur nach Vermehrung der vorher angeführten Arten in grosser Anzahl erscheinen, die Zahl der kleinen Bakterien-, Algen- und Detritusfresser dadurch beschränkend. Die Untersuchungen zeigten, dass 6—8 Stunden nach dem Aufgiessen — die Raubtiere ausgenommen — alle anderen Arten bereits erscheinen und das Leben in der Regel dann am lebhaftesten ist. Zu dieser Zeit sind auch schon die Flagellaten, Amöben, Rotatorien, Nematoden und Tardigraden anwesend. Durch die stufenweise Bevölkerung des Biotops bildet sich zwischen der grossen Menge der Organismen eine enge Nahrungskette heraus, die schliesslich zur Gewährleistung des biologischen Gleichgewichts führt. In diese Nahrungskette schalten sich natürlich auch die anderen, jetzt nicht behandelten Mikroorganismen ein. Um dies zu unterstützen, soll nur ein einziger Fall hervorgehoben werden. Laut Abb. 5 vermögen einige Amöben auch Nematoden zu phagozytieren. Vom Standpunkt der Nahrung verteilen sich die Ciliaten folgendermassen: 4 Arten ernähren sich von Bakterien, 1 von Bakterien und Algen, 5 von Bakterien und Detritus, 4 von Algen, 3 von Algen und Pilzsprossen, 1 von Algen und Flagellaten, 4 von Detritus, 13 sind Raubtiere (7 fressen Ciliaten und 6 Flagellaten), 1 Art ernährt sich von beschalten Amöben und schliesslich 1, die *Paraglaucoma rostrata*, die zwar auch Algen frisst, isst mit Vorliebe die im Innern der zugrunde gegangenen Amöben, Rotatorien und Makrobioten befindlichen organischen Stoffe auf, sie ist also auch saprophag. Die obige Verteilung zeigt, dass die Anzahl der Raubtiere sehr hoch ist und so die Zahl der Bakterien-, Algen- und Detritusfresser beschränkt wird, das biozönotische Gleichgewicht also erhalten bleibt.

Die Entleerungsfrequenz der pulsierenden Vakuolen muss ebenfalls betont werden. Während im Flechtenbiotop die Entleerungsfrequenz im allgemeinen 14 Sekunden betrug, zeigte die Frequenz bei den Bewohnern des Moosrasens eine durchschnittliche Entleerungszeit von 19 Sekunden. Es muss jedoch bemerkt werden, dass von 37 Arten nur bei 19 die Entleerungszeit gemessen wurde. Von den 19 Arten war die Entleerungszeit von nur 5 unter 14 Sek., bei den übrigen hingegen wurde eine Entleerungszeit von über 14 Sek., bei 8 Arten sogar über 20 Sek. gemessen. Der Durchschnitt von 19 Sek. ist eine sehr

langsame Entleerung gegenüber den Verhältnissen unter der Flechte. Dies ergibt sich daraus, dass die dicke Humusschicht unter dem Moosrasen viel Wasser speichert, die Lösungswirkung eine längere Zeit hindurch zur Geltung kommt und infolgedessen die Konzentration steigt. So gelangt die Konzentration des Wassers im Biotop zu dem Grad, der im Vergleich mit der inneren Konzentration der Bewohner einen nahezu isotonischen Zustand bedeutet, somit sind die Tiere der gesteigerten Gefahr der Überflutung durch Wasser nicht mehr ausgesetzt. Die eine längere Zeit dauernde Lösungswirkung kann jedoch die Konzentration nicht bis zum Äussersten erhöhen, weil diese durch die grössere Wassermenge ausbalanciert wird.

Nun soll ein Blick auf die Wassermenge geworfen werden. Die Frage taucht auf, welche Wassermenge dazu genügt, um — trotz des Festlandcharakters des Biotops — ausgesprochenen Wasserorganismen eine Lebensmöglichkeit zu gewährleisten. Die Entscheidung der Frage stösst auf grosse Schwierigkeiten, die sich vor allem daraus ergeben, dass sich eine bedeutende Wassermenge zwischen den Moosblättchen ansammelt, die Ciliaten hingegen in dem Wasserraum zwischen den Klumpen leben. Auf Grund einer einfachen Beobachtung konnte — obwohl nicht quantitativ — auf die Wassermenge gefolgert werden. Das Sammeln wurde nach einem Regentag vorgenommen, als der Moosrasen noch mit der Hand auspressbares Wasser enthielt. Das Material stand 2 Tage lang bei Zimmertemperatur, sodann nach einem Transport von 3 Tagen weitere 3 Tage bei Laboratoriumstemperatur. Da konnte man schon kein Wasser herauspressen und das Material erweckte selbst beim Berühren kein Feuchtigkeitsempfinden. Es wurde nach einem 8tägigen Stehen mit Wasser aufgegossen und sofort (!!) unter dem Mikroskop untersucht. Zur grössten Überraschung entfaltete sich ein reges Leben. Daraus kann geschlossen werden, dass die im Moos gespeicherte Adhäsions- und kapillare Wasserschicht zum aktiven Leben der Protozoen genügt, was übrigens bei den bodenbewohnenden Mikroorganismen eine feststehende Tatsache ist[7].

Wollte man die Frage beantworten, inwiefern die Ciliatenfauna des Moosrasens zum Prozess der Humusbildung beiträgt, so müsste all das wiederholt werden, was im Zusammenhang mit dem Flechtenbiotop bereits beschrieben wurde. Zweifellos wird die Flechtendecke von dem Moosrasen als nächste Sukzession abgelöst, bei Verwendung der von den Flechten vorbereiteten dünnen Humusschicht. Unter dem Moosrasen gehen vor allem wegen der grösseren Wasserkapazität intensivere Lösungs- und Zersetzungsprozesse vor sich, deren Folge die in Zentimetern messbare Anhäufung der Trümmer und des Humus ist. Diese dickere Schicht bietet einer nicht nur an Arten, sondern auch an Individuenzahl reicheren Fauna Lebensmöglichkeit. Im Gegensatz zu den in 1 ml Wasser unter der Flechte gezählten 1000—1200 Individuen bedeutet die Individuenzahl von 1384—1490 unter dem Moosrasen einen wesentlichen Anstieg. Die in bezug auf den Flechtenbiotop gemachten Festellungen gelten

eben mit Rücksicht auf die grössere Individuenzahl für den Moosrasen in noch grösserem Masse.

Für den Boden besitzt der Kreislaufsprozess des Stickstoffes erstrangige Bedeutung. Die Protozoen tragen mit ihren Stoffwechselprodukten, vor allem mit den durch die pulsierenden Vakuolen entleerten und quantitativ messbaren stickstoffhaltigen Materien dazu bei. Die im Verhältnis zum Flechtenbiotop niedrigere Entleerungsfrequenz erweckt den Gedanken, dass infolge der langsameren Entleerung weniger Stoff in die Umgebung gelangt, wie es sich auch tatsächlich verhält. Dieser Stoffmangel an Nitrogen wird jedoch durch die grössere Individuenzahl und hauptsächlich durch die mit der Wasserkapazität einhergehende längere aktive Periode ersetzt.

LITERATUR

1. Boros, J. (1938) Boldogkőváralja környékének kőzettani viszonyai. Gesteinsverhältnisse der Umgebung von Boldogkőváralja. Diss. Szeged. (Ungarisch.)
2. Gellért, J. (1942) Életegyüttes a fakéreg zöldporos bevonatában. Lebensgemeinschaft in dem grünpulverigen Überzug der Baumrinde. *Acta Sci. Math. Nat. Univ. Kolozsvár*, (8), 1—36. (Ungarisch.)
3. Gellért, J. (1950) A legkisebb vízi élettér átmeneti véglény formái. Espèces transitoires d'infusoires du minimum de biotop aquatique. *Hidrol. Közlöny*, **30**, 121—126. (Ungarisch, französische Zusammenfassung.)
4. Gellért, J. (1950) Új *Colpoda* faj ripacszuzmó alól. Neue *Colpoda*-Art unter der Flechte von Felsen. *Ann. Biol. Univ. Szeged*, **1**, 113—119. (Ungarisch, deutsche Zusammenfassung.)
5. Gellért, J. (1955) Die Ciliaten des sich unter der Flechte *Parmelia saxatilis* Mass. gebildeten Humus. *Acta Biol. Hung.*, **6**, 77—111.
6. Kahl, A. (1935) Wimpertiere oder Ciliata. Fischer, Jena.
7. Varga, L. (1936) Az erdőtalajban élő állati véglények (protozoák) életét meghatározó tényezők. Die lebensbestimmenden Faktoren der Protozoen des Waldbodens. Facteurs déterminant la vie des Protozoaires du sol forestier. The life-deciding factors of protozoa of the forest-soil. *Erdészeti Lapok*, **75**, 207—226. (Ungarisch, deutsche, französische und englische Zusammenfassung.)
8. Varga, L. (1954) A talaj állatvilága. Die Tierwelt des Bodens. In Fehér, D.: Talajbiológia. Bodenbiologie. Akadémiai Kiadó. Budapest, 835—888. (Ungarisch.)
9. Wenzel, Fr. (1953) Die Ciliaten der Moosrasen trockner Standorte. *Arch. Protistenkde.*, **99**, 70—141.

ИНФУЗОРИИ ГУМУСА, ОБРАЗОВАВШЕГОСЯ ПОД МХАМИ НА СКАЛАХ

В населенной на скалах почвообразовательной дерновинке мха живет богатая микрофауна. Автором было обнаружено 37 видов ресничных инфузорий. Моховый биотоп состоит из накопившихся под ним обломков и перегноя, который, в свою очередь, является результатом взаимодействия мха и живущих в нем микроорганизмов. Моховый биотоп обеспечивает — по сравнению с лишайным — более благоприятный экологический действующий комплекс. Его влагоемкость больше, колебания инсоляционных и температурных условий более умеренны, и гумусовый слой более мощный. Вследствие стого в моховом биотопе живет более богатая фауна ресничных. Между окружающей средой и микроорганизмами образуется взаимосвязь, проявляющая свое влияние также и на образование почвы. Продукты обмена веществ накопляются в биотопе, и создающаяся пищевая цепь обеспечивает биологическое равновесие, питающиеся детритом организмы участвуют в разложении органических веществ, погибшие же животные представляют собой важные составные части гумуса.

Обнаруженные автором инфузории в большой степени приспособились к экологическим условиям (движение, размеры тела, общее телосложение, питание).

Исследования автора указывают на то, что в дерновинке мха живет иная фауна, чем в лишайнике. Он обнаружил во мхе 7 встречающихся спорадически видов, которые в сопредельном лишайнике живут в большом количестве. Он считает последние бриоксенными видами. Автор рассматривает бриофильными те виды, которые равным образом встречаются в большом количестве как во мхе, так и в лишайнике. Отдельные виды последних живут в большом количестве активной жизнью также и в других биотопах. Бриобионтами являются 17 видов, описанных автором изо мха или рассматриваемых в литературе обитателями мха. Активность и число индивидуумов бриобионтов больше предыдущих.

Из вышесказанного следует, что дерновинка мха обеспечивает благоприятные условия для живущих в биоценозе микроорганизмов, взаимодействие которых принимает активное участие в процессе образования естественного грунта.

THE CILIATES OF THE HUMUS UNDER THE MOSS-TURF ON ROCKS

There is an extremely abundant microfauna living in the moss-turf which is settled on the rocks. 37 species of Ciliates have been found in it. The moss biotope is constituted of the detritus and humus which accumulated below it, and which, in its turn, is the result of the combined activity of the moss and the microorganisms living in it. In contrast to lichens the moss biotope assures a more favourable active environmental complex. The water capacity is greater, the fluctuations of insolation and temperature are more moderate and the humus layer is thicker. Accordingly the Ciliate fauna is more abundant in the moss biotope. Between environment and microorganisms a correlation develops which effects also the soil formation. The metabolic products accumulate in the biotope, the evolving food-chain contributes to the maintenance of the biological balance, the organisms feeding on detritus take part in the decomposition of the organic matter and ultimately the dead animals continue to play a role as important constituent parts of the humus.

The Ciliates we found adapt themselves far-reachingly to the environmental conditions (motion, body size, general build, feeding).

Our studies have shown that the fauna of the moss-turf differs from that of the lichen. Seven such species were found that occur sporadically in the moss turf and which live in large numbers in the lichen situated in its vicinity. We consider these as bryoxene species. The species living in moss and lichen alike, some of which, however, living actively in large numbers in other biotopes too, are considered bryophile species. Bryobiont species are the 17 species which we described as living in the moss or which are reported as such in the literature. The activity of the bryobiont species is higher than that of the former and the number of their individuals is larger.

It ensues from the aforesaid that the moss turf assures favourable conditions for the microorganisms that live in the biocenose and whose combined activity contributes usefully to the process of primeval soil formation.

József Gellért, Tihany, Biológia, Ungarn.

Communicationes breves

THREE PHASES IN THE LIFE OF HETEROTRANSPLANTS

GY. CSABA

DEPARTMENT OF MORPHOLOGY, RESEARCH INSTITUTE FOR EXPERIMENTAL MEDICINE OF THE HUNGARIAN ACADEMY OF SCIENCES (HEAD: I. TÖRÖ)

(Received July 4, 1955)

The present experiments had the object to ascertain the role played by factors of nutrition and assimilation in the growth of heterotransplants.

Autologous rat liver, homologous rat liver, further the liver of guinea pigs and crested newts *(Triturus cristatus)* were transplanted to the anterior chamber of white rats. The behaviour of the transplants was observed in vivo by means of a micro-illuminator, after which the eyes were worked up histologically. The capacity for growth and the vitality of the said tissues was examined also in tissue cultures, on the serum of the recipient host.

Autologous pieces of liver, implanted in the eye, were found to be capable of regeneration, if, at the same time, the untransplanted part of the liver retained its regenerative power in the organism. Pyroninophilia was observed in the biliary ducts only, where the process of regeneration originates.

Both hepatic parenchyma and biliary ducts were observed to perish within a fortnight if homologous or heterologous mammalian livers were transplanted. Newt liver was an exception to this rule: it began growing in the first week already. Not only hepatic cells but the melanophores, too, were seen to survive, the latter showing a wide zone of migration. The newt-liver cells proliferated vigorously also after the expiry of the immunologically critical period of 8 days (Fig. 1); the activity of the transplant was observable under the micro-illuminator (Fig. 1) on the one hand, and proved by the pyroninophilia of the sections on the other (Fig. 2). The activity of the cells was found to have lost nothing of its vigour even after the expiry of six weeks.

Five weeks after the transplantation, the hepatic tissue was explanted from the rat eye to homoiothermal plasma and kept in hanging drop cultures prepared with chicken embryo pulp and homoiothermal Tyrode-solution. The newt liver displayed an intensive growth in which both chromatophores and parenchyma cells were seen to participate (Fig. 3).

Rat liver perished within 48 hours both on autologous and homologous nutrient medium in experiments in vitro. A similar behaviour was shown by

guinea pig liver explanted to rat serum, while newt liver placed on isotonic rat serum proliferated vigorously.

All experiments, whether in vivo or in vitro, were made under identical conditions with tissues of identical size.

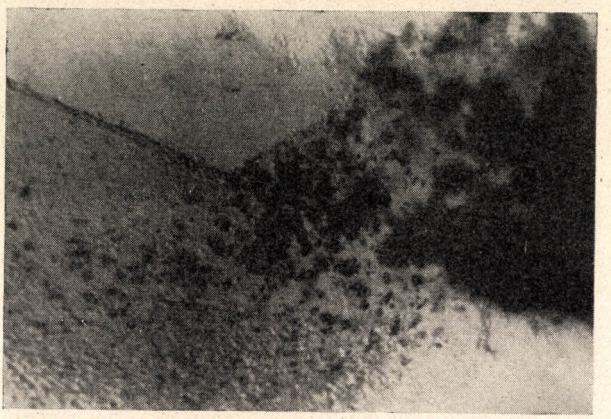


Fig. 1. 6 week old heterotransplant. Newt liver in rat eye. Photographed in vivo. Native

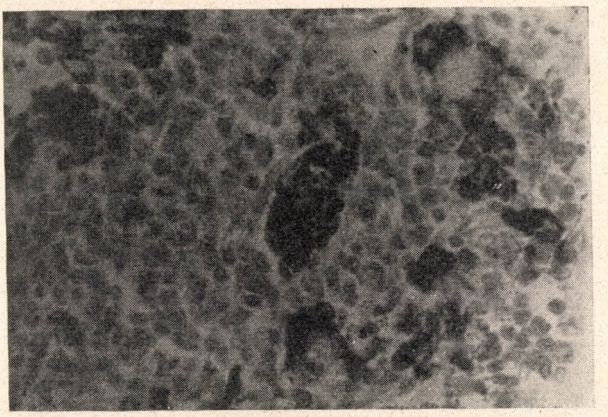


Fig. 2. 4 week old heterotransplant. Newt liver. Methyl green-pyronin

Although, under normal conditions, the percentage of γ-globulins is less in the vitreous humour of the eye than in the blood serum, the former will increase under the effect of traumatization or in the presence of a foreign body,

in this case the transplant, to become finally equal to the latter. Save in the case of autologous transplantations, the immune reaction actually did set in, as was indicated by the intensive plasma cell reaction. In view of the great racial difference between the original and the recipient host the immune-biological reaction could have been expected to be even stronger when newt liver was transplanted than in the case of, say, homologous transplantations.

The experiments afford the conclusion that transplanted newt liver, in contradiction to other homologous and heterologous transplants, is capable of retaining its vitality during a comparatively long time: in our case it did

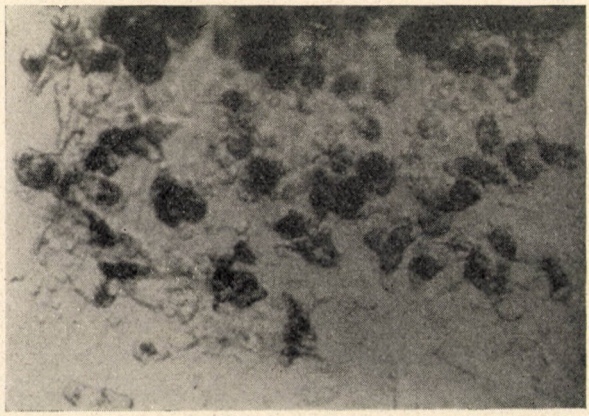


Fig. 3. Zone of growth of newt liver explanted from eye after 5 weeks. Native

so for not less than 6 weeks, i. e. the whole duration of the experiments. On the strength of the experiments it can be further assumed that transplants have to pass through three different phases: 1. the phase of local traumatization and local nutritional disturbance, 2. that of assimilation and adaptation, 3. the period of the genesis of immune substances.

1. Local traumatization is due to set in irrespective of the nature of the transplanted tissue, surgical technique playing an important role in it. The phase in question includes the transplantation itself and a few hours subsequent to it. Temporally, it corresponds to the latent period of tissue cultures. Most of the highly differentiated tissues perish in this phase as was the case with mammalian livers which were seen in our experiments to be unable to regenerate after transplantation to tissue cultures even if placed on autologous nutrient media. Other kinds of experiments made in our Institute substantiate the correctness of this observation [1]. On the other hand, newt liver, as also other phylogenetically or ontogenetically inferior tissues, are capable of surviving this first phase.

2. In the second phase, the transplant has to adapt itself to the alien medium both in vivo and in vitro. Experiments of adaptation in vitro are known from the literature [2, 3, 4, 5]. There are tissues, the mammalian testis for instance, which perish on heterologous nutrient medium also in vitro, i. e. are incapable to survive until the appearance of the immune reaction.

3. In the third phase, the transplant comes under the action of the immune substances. As a rule, both hetero- and homotransplants perish in this period. It was justified to expect a sure destruction of the newt liver transferred to the rat eye. The experiments, having proved the contrary, seem to justify the assumption that tissues, phylogenetically of a lower order and therefore more capable of utilizing alien nutriment, are able to survive the second phase, e. g. that of assimilation and adaptation, and that this is the probable explanation of their passing unscathed through the third phase as well.

It appears from the present experiments that the second phase, that of assimilation and adaptation, determines the destiny of the transplant because, once the transferred tissue has been able to adapt itself to the new medium during this period, the immune-biological reaction of the recipient host ceases to be of decisive influence on its further survival.

REFERENCES

1. BARKA, T., TÖRŐ, I., PÓSALAKY, Z. (1953) The role of nucleic acids in the growth in vitro of liver tissues. *Acta Morph. Hung.*, **3**, 437—448.

2. GAILLARD, P. J. (1954) Greffes à l'homme de tissus cultivés in vitro. *Rev. Med. Liège*, **9**, 271—276.

3. GAILLARD, P. J. (1954) Transplantation of cultivated parathyroid gland tissue in man. In Preservation and Transplantation of Normal Tissues. *Ciba Foundation Symposium* 100—109.

4. LANGMAN, J. (1953) Tissue culture in autologous, homologous and heterologous media. *Proc. Con. Ned. Akad. C.*, **56**, 1—5.

5. LANGMAN, J. (1953) Tissue culture of embryonic tissue fragments in syngenesiologous, homologous and heterologous media. *Proc. Con. Ned. Akad. C.*, **56**, 6—16.

GYÖRGY CSABA, Budapest, IX., Tűzoltó u. 58. Hungary

PHYSIOLOGICAL ASPECTS OF A ROUGH FORM OF *USTILAGO MAYDIS*

K. SZENDE

INSTITUTE OF GENETICS, BUDAPEST (DIRECTOR: B. GYŐRFFY)

(Received November 30, 1955)

Several morphological alterations, due to mutation, are known in the fungus *Ustilago maydis* (DC.) Cda. [7]. Induced changes in the metabolic pattern were also observed [5]. The results reported in this paper are concerned with a morphological alteration of this fungus and it is suggested that this alteration is in connection with the change of its metabolism.

After UV irradiation a colony was isolated from an originally smooth strain fairly constant on its characters. This isolate was, however, labile and in the progeny there occurred extreme rough colonies (Fig. 1). The relative ratio of rough type cells to smooth ones (R/S) increases with the age of the culture, and the fact that the culture is grown in liquid or in solid medium has no significant effect on this ratio.

The cells were grown in liquid culture, in the presence of Na-diethyldithiocarbamate (DIECA), and they were harvested after 48 hrs, diluted to a suitable concentration and plated on sucrose-nutrient-agar. In this case the R/S ratio shifted, favouring the appearance of rough colonies. The effect of DIECA on growth is remarkable, because it resulted in an "inversion growth" [6], i. e. the growth curve possessed two peaks, depending on the DIECA concentration. The growth is expressed in cells per ml, counted with haemocytometer, after a growth of 48 hours. In the DIECA concentration examined the largest inhibition was obtained at 10^5—10^6 M. The highest frequency of the occurrence of rough colonies was near the lethal concentration of DIECA (Graph 1, Figs. 2 and 3).

The DIECA is a complex-forming agent, and thus we supposed that it interfered with the metal metabolism of the cells. To prove this assumption we tested other complex-forming agents under similar experimental conditions. α,α'-dipyridyl, Na-EDTA, o-phenanthroline were added to the medium; however, they altered the R/S ratio under the conditions of our experiments but insignificantly. Similarly, when metal ions were added, the alteration of the R/S ratio observed was unequivocal.

These isolated rough colonies reverted more or less to a smooth type. These reverted smooth colonies are similar in their appearance to the original smooth type. The rough character was inherited in the progeny of crosses between

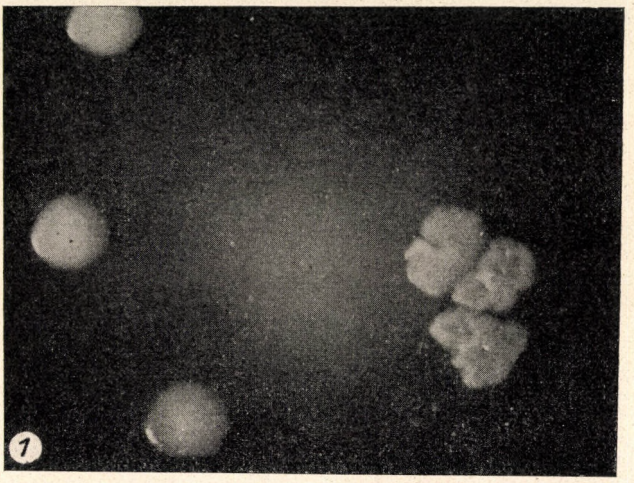
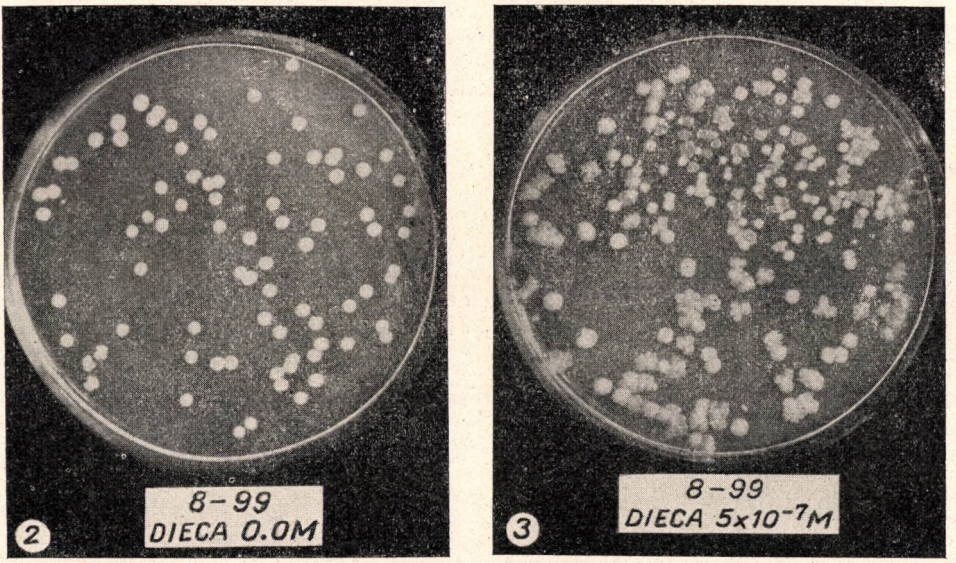


Fig. 1. U. maydis. Smooth and rough cnlonies



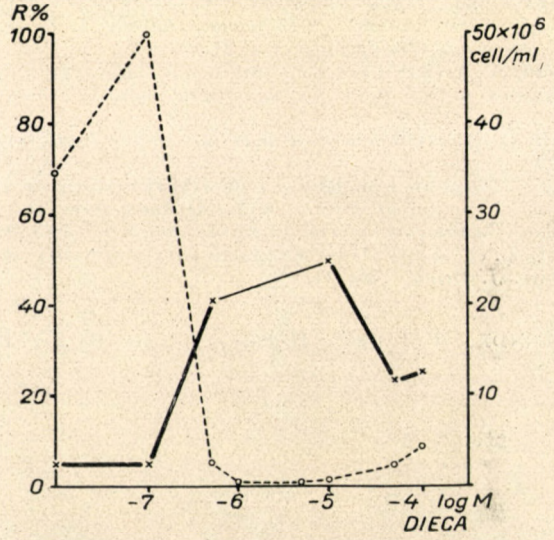
Figs. 2. and *3.* The effect of DIECA on the R/S ratio (No DIECA and DIECA in 5×10^{-7} M concentration, respectively)

the rough type and other strains. In mixed populations the rough type cells exerted an effect on the population and shifted the R/S ratio towards the rough appearance of the colonies. Intermediate types also appeared, they have circular fold or folds on the surface, or have rough character, but the margins of these colonies are rounded.

In cultures showing smooth surface such intermediate types never appeared; nevertheless, when mixed with rough type cells in a low proportion, the

intermediate colonies appeared immediately and they represented the major proportion of the population.

It is known that there is a correlation between the roughness of the colonies and the biochemical potentialities of their cells. IMSHENETSKY [2, 3] observed that in rough colonies of irradiated yeasts and *Aspergilli* the activity of amylase and proteinase is altered. The induced rough strains of yeast produced 80—100 per cent more cell mass than the original smooth one [4]. BRAUN [1] observed that *Brucella* accumulates alanin in the culture medium and this accumulated metabolic byproduct is inhibitory to the susceptible smooth type cells ; *Salmo-*



Graph 1. The effect of DIECA on the growth of *U. maydis* and on the R/S ratio. (Dotted line : cell number per ml after 48 hours' growth ; solid line : per cent of R colonies)

nella (threonine), *B. tularense* (unknown substance) and supposedly several other microorganisms behave similarly.

The data obtained in our experiments indicate that, 1. the fungus shows "inversion growth" under the influence of DIECA ; 2. the resistance of rough type cells to DIECA is higher than that of the smooth ones ; and 3. in mixed populations a diffusible product or metabolic intermediate accumulates, which is capable of shifting the original R/S ratio towards the rough and intermediate types in spite of the fact that the cells of these two types of colonies possess nearly the same growth rates. Little is known about the site of the action of DIECA in the cell metabolism and it is difficult to give an explanation of the alteration observed in the metabolic pattern. The situation is perhaps more complicated because DIECA degradates in solution rapidly and perhaps it is some products of this decomposition that caused the effects obtained. It is

also a very likely assumption that there is an interaction between the DIECA or its degradated products and the diffusible substances of the cells, resulting in shifts in the R/S ratio.

The author wishes to express his most sincere thanks to dr. BARNA GYŐRFFY for invaluable discussion and criticism and is indebted to Miss CLARA BIRÓ for valuable technical assistance.

REFERENCES

1. BRAUN, W. et al. (1951) The effect of metabolites upon interactions between variants in mixed *Brucella abortus* populations. *J. Bact.*, **62**, 45—52.

2. *Имшенецкий, А., Перова, К.* (1951) Образование амылазы складчатыми расами *Asperillus niger*, *Докл. Акад. Наук СССР*, **81**, 685—687.

3. *Имшенецкий, А. А.* (1952) О накоплении биомассы в кулмурах складчатой формы *Sacharomyces cerevisiae*. *Микробиология*, **21**, 3—13.

4. *Имшенецкий, А. А.* (1955) К физиологической характеристике вариантов микроорганизмов, полученных при помощи сильнодействующих факторов. *Микробиология*, **24**, 285—290.

5. PERKINS, D. D. (1949) Biochemical mutants in the smut fungus *Ustilago maydis* *Genetics*, **34**, 606—626.

6. SIJPESTEIJN, A. K., VAN DER KERK, J. M. (1954) Investigations on organic fungicides. IX. The antagonistic action of certain imidazole derivatives and α-keto acids on the fungitoxicity of dimethyldithiocarbamates. *Biochim. Biophys. Acta*, **15**, 67—77.

7. STAKMAN, E. C. et al. (1943) Genetic factors for mutability and mutant characters in *Ustilago zeae*. *Amer. J. Botany*, **30**, 37—48.

KÁLMÁN SZENDE, Budapest, Herman O. út 15/17, Hungary.

EMPLOYMENT OF ANTI-ANTISERA FOR THE REDUCTION OF INCOMPATIBILITY PROVOKED BY HETERO-TRANSPLANTATION

GY. CSABA

DEPARTMENT FOR MORPHOLOGY, RESEARCH INSTITUTE FOR EXPERIMENTAL MEDICINE OF THE HUNGARIAN ACADEMY OF SCIENCES, BUDAPEST (HEAD: I. TÖRŐ)

(Received March 10, 1956)

Heterotransplants are usually destroyed by immune substances produced in the recipient host. If we succeed in lastingly checking or completely stopping the production of immune substances, it can be expected that tissues capable of assimilating alien proteins [1] will survive and grow. The stoppage of the formation of immune substances must have a specific character as a lasting and general obstruction of the immune system might lead to grave infections and other complications. The aim of the present experiment was, therefore, to prevent the production of immune substances only in respect of a special group of proteins, namely those of the transplanted heterologous tissue.

The experiments were based on the following considerations (Fig. 1a):

If proteins from the tissue of animal (A) are injected into animal (B), the latter will produce immune substances that are antagonistic to tissue (A). If, after due immunization, the serum of animal (B) is injected into animal (C), the latter will produce immune substances of a double character: they will be antagonistic to tissue (B), i. e. have an anti- (B) character on the one hand, and, since serum (B) contains anti- (A) substances, they will be antagonistic to these anti- (A) substances, i. e. have an anti- (anti A) character on the other hand. After the immunization of animal (C) with serum (B), transplantation takes place from animal (A) into animal (C), whereupon the latter will produce anti- (A) substances, and it can be assumed that they will arise on the same sites (spleen, lymph nodes, liver, etc.) where the anti- (anti A) substances were previously formed under the effect of serum (B). Neutralizing each other on the very site of their production, these two immune substances will not get into the circulation so that, there being nothing to damage it, the transplant will survive and start growing.

Dogs were used as donors, i. e. as animals (A), in the present experiments: their spleen served partly as antigen and partly as transplant; rabbits were chosen as intermediate hosts, i. e. as animals (B), while mice were used as recipient hosts, i. e. as animals (C) (Fig. 1b).

Out of 40 mice used in the experiments, 10 served as controls. Dog-spleen antigen, in a concentration of 1 : 5, was injected into 5 rabbits, each of them

receiving a dose of 18 ml distributed over 16 days. Blood was drawn from the rabbits two weeks after the last injection. The titre of the total immune serum was above 1 : 64 000.—. A dose of 1,35 ml, distributed over 20 days, was injected into each of the mice. The transplantation itself was performed 10 days after the last injection ; following splenectonomy, a piece, excised from the dog spleen, that had remained after having been first used as antigen, was transferred under sterile conditions into the omentum of the recipient host. Two animals succumbed to the operation. The transplants were removed from the mice after the lapse of 1 and 2 months, respectively.

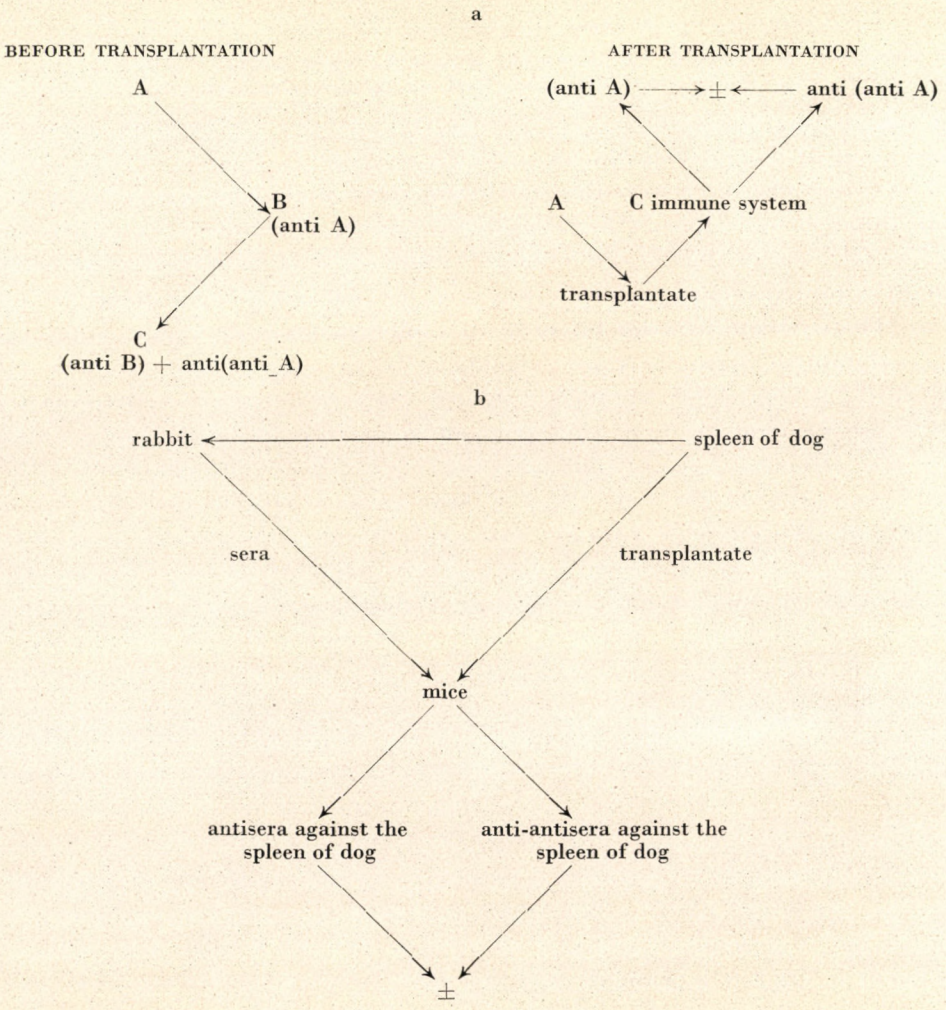


Fig. 1. The theoretical (a) and the practical (b) schema

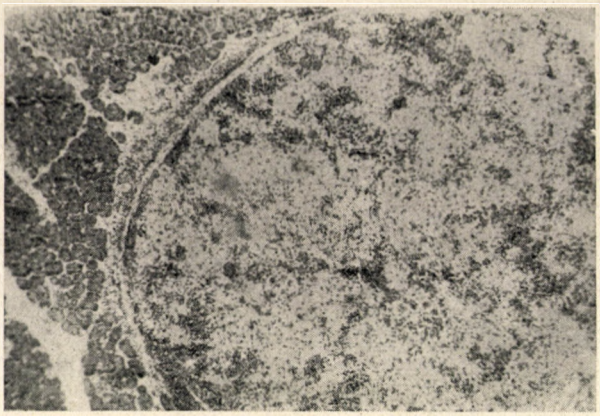


Fig. 2. Transplanted heterologous dog spleen in pretreated recipient after 1 month. 100× Haem.-Eos.

Fig. 3. Transplanted heterologous dog spleen (indicated by arrow) grown to 8 times its original size in the abdominal cavity of the mouse

Dog spleen transplanted into the control animals was found to be completely destroyed within 2 weeks. The survival or growth of the transplants was not observed in any of the controls.

The transplants in the test animals, if examined a month after operation, presented a picture corresponding to that of 2 week old autologous spleen transplants. A scattered network of lymphoid cells, follicle-like formations, megakaryocite-like giant cells, and wide sinuses with much fresh blood were

observed in them. The transplants were visible to the naked eye. No reaction marked by characteristic of alien body was observed (Fig. 2).

As regards the transplants removed after 2 months, even a macroscopical inspection showed them to have grown considerably. In some cases they were about 8 times the size of the originally transplanted pieces of tissue (Fig. 3).

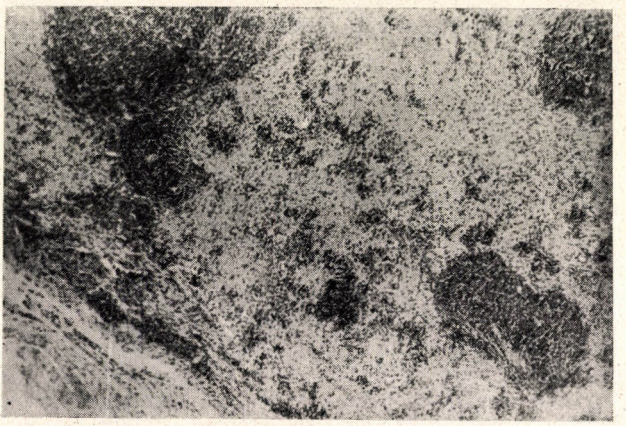


Fig. 4. Two-month old heterotransplant of recipient animal pretreated with the alternate method. Pronounced follicles. Characteristic central artery. Wide blood sinuses. 100 × Haem.-Eos.

They had the colour of the spleen, were peritonized and, in the majority of the cases, were found to be suspended from peduncles ; the thick vessels running in the peduncles were well observable. Examined through the microscope, the transplants presented a markedly splenic structure. The blood sinuses were wider than those seen in normal spleens, but the scattered follicles could be well observed (Fig. 4). The central arteries were most characteristic. The organ was seen to be capsuled and to contain many megakaryocite-like giant cells.

Author's method gave still better results when, instead of mixing up the different anti- (A) sera obtained from various rabbits, they were injected one after the other into the mice (alternate method). One third of the test animals were so treated.

The percentage of the surviving heterotransplants that began to grow in the new environment amounted to 70.

On the strength of the experiments it seems to be safe to claim that the method as described in the foregoing is sound, and that heterologous spleen, if transplanted to a recipient host pretreated according to our method, behaves in the new environment as if it were autologous.

A more detailed communication about this subject will be published in this paper.

REFERENCE

CSABA, GY. (1956) Three phases in the life of heterotransplants. *Acta Biol. Hung.*, **6**, 361—364.

GYÖRGY CSABA, Budapest, IX., Tűzoltó u. 58., Hungary.

INDEX

KRÁMLI, A.—LANTOS, J.—STUR, J. Die Wirkung von Redoxsystemen auf den Stoffwechsel von Mikroorganismen. II. Redoxpotential-Untersuchungen am Hefe-C-Hämin-komplex — Действие окислительно-восстановительных систем на обмен веществ микроорганизмов. II. Исследования окислительно-восстановительного потенциала в комплексе дрожжей-С-гемина — The Action of Redox-systems on the Metabolism of Microorganisms. II. Oxydation-reduction Potential Investigations on the Yeast-C-haemine-Complex 185

KRÁMLI, A.—LANTOS, J. Die Wirkung von Redoxsystemen auf den Stoffwechsel von Mikroorganismen. III. Einwirkung der Thioglykolsäure auf die Ergosterinproduktion in Hefekulturen — Действие окислительно-восстановительных систем на обмен веществ микроорганизмов. III. Влияние тиогликолевой кислоты на продукцию эргостерина в культурах дрожжей — The Action of Redox-systems on the Metabolism of Microorganisms. III. Effect of Thioglycolic Acid on the Ergosterine Production in Yeast Cultures 193

KRÁMLI, A.—SZABÓ, A. Die Wirkung von Redoxsystemen auf den Stoffwechsel von Mikroorganismen. IV. Veränderung der Riboflavinproduktion in geschüttelten Kulturen von *Eremothetium ashbyii* — Действие окислительно-восстановительных систем на обмен веществ микроорганизмов. IV. Изменение продукции рибофлавина во взболтанных культурах *Eremothetium ashbyii* — The Action of Redox-systems on the Metabolism of Microorganisms. IV. The Change of Riboflavine Production in Shaken Cultures of *Eremothetium ashbyii* 197

HORTOBÁGYI, T. Algenteratologien im Seston des Balaton und ihre entwicklungsgeschichtlichen Beziehungen — Случаи тератологии водорослей из сестона оз. Балатон и их значение в истории развития — Les algues tératologiques dans le Seston du Lac Balaton et leur importance du point de vue de l'évolution 203

SZENTÁGOTHAI, J.—SZÉKELY, GY. Zum Problem der Kreuzung der Nervenbahnen — О проблеме перекрещивания нервных путей — On the Problem Concerning the Decussation of Nervous Pathways 215

KISS, I. Das Entstehen von Zellen aus Plasmateilchen pflanzlicher Mikroorganismen — Преобразование плазматических частиц растительных микроорганизмов в клетки — The Development into Cells of the Plasma Particles of Plant Microorganisms 231

GERE, G. The Examination of the Feeding Biology and the Humificative Function of Diplopoda and Isopoda — Исследование биологии питания Diplopoda и Isopoda и их роли в гумификации — Untersuchung der Ernährungsbiologie der Diplopoden und Isopoden und ihre Rolle in der Humifikation 257

CSABA, GY.—ISKUM, M. Reaction of Newborn Rats to the Heterologous Transplantation of Ehrlich's Mouse-ascites Tumour — Реакция новорожденных крыс на гетеротрансплантацию асцитической опухоли Эрлиха белой мыши — Reaktion der neugeborenen Ratten auf die heterologe Überimpfung des Ehrlichschen Ascites-Tumors der Maus 273

HAJÓSSI, GY.—GUBA, F. Die submikroskopische Zellmembran von *Endamoeba blattae* BÜTSCHLI — Субмикроскопическая клеточная оболочка у *Endamoeba blattae* BÜTSCHLI — Submicroscopic Cell-membrane of *Endamoeba blattae* BÜTSCHLI 279

PÁRDUCZ, B. Reizphysiologische Untersuchungen an Ziliaten. IV. Über das Empfindungs- bzw. Reaktionsvermögen von *Paramecium* — Исследование физиологии возбуждения ресничатых инфузорий. IV. Возбудимость туфельки (*Paramecium*) — Studies on the Reactions to Stimuli in the Ciliate Infusoria. IV. On the Power of Response to Stimuli of *Paramecium* 289

FERENCZY, L. Occurrence of Antibacterial Compounds in Seeds and Fruits — Антибактериальные вещества в семенах и плодах — Vorkommen von antibakteriellen Verbindungen in Samen und Früchten 317

FELFÖLDY, L. J. M. Effect of Narcotics and other Poisons on the Water-Retaining Capacity of Detached Leaves — Действие наркотиков и других ядов на водоудерживающую способность оторванных листьев — Die Wirkung von Narkotika und anderen Giften auf die Wasserzurückhaltung von gepflückten Blättern 325

GELLÉRT, J. Ciliaten des sich unter dem Moosrasen auf Felsen gebildeten Humus — Инфузории гумуса, образовавшегося под мхами на скалах — The Ciliates of the Humus under the Ross-turf on Rocks 337

COMMUNICATIONES BREVES

CSABA, GY. Three Phases in the life of Heterotransplants 361

SZENDE, K. Physiological Aspects of a Rough Form of *Ustilago maydis* 365

CSABA, GY. Employment of Anti-antisera for the Reduction of Incompatibility Provoked by Heterotransplantation 369

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója — Műszaki felelős: Farkas Sándor

A kézirat nyomdába érkezett: 1956. III. 20. — Terjedelem: 16,65 (A/5) ív, 131 ábra

Akadémiai Nyomda, Gerlóczy u. 2. — 39167/56 — Felelős vezető: Puskás Ferenc

Les *Acta Biologica* paraissent en russe, français, anglais et allemand et publient des travaux du domaine des sciences biologiques.

Les *Acta Biologica* sont publiés sous forme de fascicules qui seront réunis en un volume.

On est prié d'envoyer les manuscrits destinés à la rédaction et écrits à la machine à l'adresse suivante :

Acta Biologica, Budapest, IX., Tűzoltó u. 58.

Toute correspondance doit être envoyée à cette même adresse.

Le prix de l'abonnement est de 110 forints par volume.

On peut s'abonner à l'Entreprise pour le Commerce Extérieur de Livres et Journaux «*Kultúra*» (Budapest, VI., Sztálin út 21. Compte-courant No. : 43-790-057-181) ou à l'étranger chez tous les représentants ou dépositaires.

The *Acta Biologica* publish papers on biological subjects in Russian, French, English and German.

The *Acta Biologica* appear in parts of varying size, making up one volume.

Manuscripts should be typed and addressed to :

Acta Biologica, Budapest, IX., Tűzoltó u. 58.

Correspondence with the editors and publishers should be sent to the same address.

The rate of subscription to the Acta Biologica, is 110 forints a volume. Orders may be placed with «*Kultúra*» Foreign Trade Company for Books and Newspapers (Budapest, VI., Sztálin út 21. Account No. 43-790-057-181) or with representatives abroad.

Die *Acta Biologica* veröffentlichen Abhandlungen aus dem Bereiche der biologischen Wissenschaften in russischer, französischer, englischer und deutscher Sprache.

Die *Acta Biologica* erscheinen in Heften wechselnden Umfanges. Mehrere Hefte bilden einen Band.

Die zur Veröffentlichung bestimmten Manuskripte sind, mit Maschine geschrieben, an folgende Adresse zu senden :

Acta Biologica, Budapest, IX., Tűzoltó u. 58.

An die gleiche Anschrift ist auch jede Korrespondenz für die Redaktion und den Verlag zu senden.

Abonnementspreis pro Band 110 Forint. Bestellbar bei dem Buch- und Zeitungs-Aussenhandels-Unternehmen «*Kultúra*» (Budapest, VI., Sztálin út 21. Bankkonto Nr. 43-790-057-181) oder bei seinen Auslandsvertretungen und Kommissionären.

48,— Ft